



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Neil Grant Venter

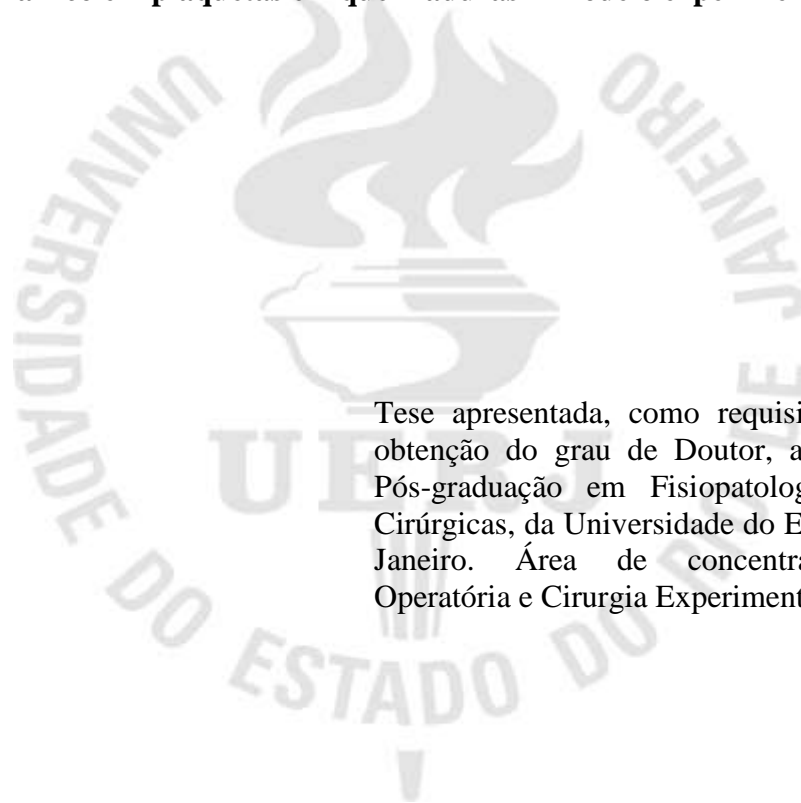
**Uso de plasma rico em plaquetas em queimaduras – Modelo experimental
em ratos**

Rio de Janeiro

2014

Neil Grant Venter

Uso de plasma rico em plaquetas em queimaduras – Modelo experimental em ratos



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Coorientadora: Prof.^a Dra. Andréa Monte AltoCosta

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V465 Venter, Neil Grant.
 Uso de plasma rico em plaquetas em queimaduras – Modelo experimental
 em ratos / Neil Grant Venter. – 2014.
 75 f.

 Orientador: Ruy Garcia Marques.

 Coorientadora: Andréa Monte Alto Costa.

 Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
 Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências
 Cirúrgicas.

 1. Plasma rico em plaquetas . 2. Queimaduras - Tratamento - Teses. 3.
 Pele - Reparos e reconstrução - Teses. 4. Cicatrização de feridas - Teses. 5.
 Modelos animais de doenças.6. Ratos. I. Marques, Ruy Garcia. II. Costa,
 Andréa Monte Alto. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
 Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

 CDU 615.38:616.5-001.17

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese,
desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Neil Grant Venter

Uso de plasma rico em plaquetas em queimaduras – Modelo experimental em ratos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Aprovada em 26 de novembro de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques
Faculdade de Ciências Médicas– UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Andréa Monte Alto Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes– UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Maria Cristina Araujo Maya
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Dr. Fernando Serra Guimarães
Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ

Prof. Dr. Alberto Schanaider
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Rossano Kepler Alvim Fiorelli
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Carlos Sampaio Nunes da Silva e Storm Rose, e ao meu irmão, Wayne Gordon Venter, pessoas que moldaram meu caráter.

AGRADECIMENTOS

Com o findar desta jornada, na busca do conhecimento, onde houve momentos de alegria e de dificuldades já superadas, é necessário lembrar e agradecer a quem a tornou menos árdua. Com esta lista, sem nenhuma ordem de preferência, agradeço do fundo do coração:

Ao meu pai, José Carlos Sampaio Nunes da Silva (*in memoriam*), a pessoa a quem tenho a maior admiração, um exemplo de inspiração.

À minha mãe, Storm Rose, mulher dedicada à família e de amor infinito.

Ao meu irmão, Wayne Gordon Venter, sempre orgulhoso das minhas conquistas.

À Ana Lidia de Souza Borges, que sempre tenta me fazer uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, Prof. Ruy Garcia Marques, uma pessoa a quem devo muito em relação à minha vida acadêmica, o qual demonstra mais carinho por mim do que muitos pais em relação aos seus próprios filhos.

À minha coorientadora, Prof^a Andréa Monte Alto Costa, que me recebeu de braços abertos sem seu laboratório e foi primordial para eu conseguir completar esta jornada.

Ao professor Michel Reis Messoria, pelo indispensável auxílio no início da pesquisa e com o preparo do PRP.

À Jeanine Salles dos Santos, que auxiliou a pesquisa de forma incalculável e deu incentivo nas maiores dificuldades na bancada.

À Adriana Paulino do Nascimento, sempre prestativa a auxiliar na minha pesquisa e em dirimir muitas dúvidas.

Ao Carlos Eduardo Rodrigues Caetano, um veterinário de grande coração e dedicação.

Ao Domingos Henrique de Souza Peçanha, um braço direito no Laboratório de Cirurgia Experimental e na disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Às bioteristas Alessandra Demétrio do Nascimento e Alessandra do Nascimento Vieira, pelo auxílio na parte cirúrgica e no manejo de animais.

À Carla Braga Mano Gallo, pelo auxílio no período da minha permanência do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

À Bruna Romana de Souza, Fernanda Seabra Schanuel, Thatiana Luiza Assis de Brito Carvalho e outros membros do Laboratório de Reparo Tecidual, que me acolheram neste período.

À Caroline Bazileu Marcello Mota, pelo auxílio linguístico do texto.

The measure of greatness in a scientific idea is the extent to which it stimulates thought and opens up new lines of research.

Paul A.M. Dirac

RESUMO

VENTER, Neil Grant. **Uso de plasma rico em plaquetas em queimaduras – Modelo experimental em ratos**. 2014. 75 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

As queimaduras são eventos comuns e recorrentes no dia a dia dos atendimentos médicos. Há uma constante busca para entender a sua fisiopatologia, no intuito de minimizar seus resultados devastadores. Plasma rico em plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas com capacidade de liberação local de múltiplos fatores de crescimento (FC) que aceleram a cicatrização. Este estudo consiste em dois experimentos: o primeiro visa validar um modelo experimental para a criação de queimaduras de tamanho e profundidade padronizados e, o segundo, avalia o uso de PRP em queimaduras. Para o desenvolvimento de queimaduras na validação do modelo experimental, foi idealizado um equipamento que permitisse o controle preciso da temperatura, além da utilização em conjunto de uma técnica inovadora de fixação que garante pressão constante no momento das queimaduras. Para o primeiro experimento, foram utilizados 12 ratos, por grupo, submetidos a queimaduras de 60 °C, 70 °C ou 80 °C por dez segundos, com um equipamento que desenvolvemos. Metade dos animais de cada grupo foi morta no terceiro dia e suas feridas foram analisadas por histologia, e, na outra metade, a ferida foi mensurada e acompanhada até o seu fechamento. No uso de PRP em queimaduras, foram avaliadas queimaduras de segundo grau (SG), segundo grau com diabetes *mellitus* induzido (SGD) e queimaduras de terceiro grau (TG). Noventa animais foram distribuídos em três grupos (SG, SGD e TG), onde, em cada um, dez animais foram tratados, dez serviram de controle e dez foram utilizados para o preparo do PRP. As áreas das feridas foram acompanhadas até o vigésimo primeiro dia, quando os animais foram mortos e biópsias de pele foram realizadas. Os resultados da validação do modelo mostram que as queimaduras produzidas com 60° C foram de SG superficial (28% da derme envolvida); com 70° C foram de SG profundo (72% da derme envolvida); e com 80° C foram de TG (100% da derme envolvida). Em relação ao uso de PRP em queimaduras, observou-se que nos grupos tratados SG e SGD houve aceleração do fechamento da ferida e redução no número de células CD31, CD163, CD68, MPO e TGF- β positivas, e aumento do número de células MMP2 positivas. A neoepiderme foi mais fina nos controles dos grupos SG e SGD, e o tecido de granulação foi reduzido nos controles SGD e TG. O modelo utilizado é seguro e confiável para produzir queimaduras regulares e uniformes, de diâmetros variados, pela capacidade do controle fino da temperatura e pelo posicionamento do animal, e reprodutíveis. PRP parece acelerar a cicatrização de queimaduras de SG e SGD, mas não de TG.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas. Queimaduras. Cicatrização. Modelo experimental. Rato.

ABSTRACT

VENTER, Neil Grant. **Use of plasma-rich plasma in buns –Experimental model in rats.** 2014. 75 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Burns are common and recurring events in the daily lives of medical care. There is a constant search to understand its physiopathology, in order to minimize its devastating results. Platelet-rich plasma (PRP) is a platelet concentrate with capacity of local release of multiple growth factors (FC) that accelerate healing. This study consists in two experiments: the first to validate an experimental model for the creation of standardized burns in size and depth and the second to evaluate the use of PRP in burns. The burns were achieved in an experimental burn model using an equipment that we developed and allows precise temperature control and in association with a innovative fixation technique that creates a constant pressure. Twelve rats per group underwent burns at 60°C, 70°C or 80°C for 10 seconds, with a device that we developed. Half of the animals of each group was killed on the third day and their wounds were analyzed by histology, and in the other half the wounds were measured and monitored until their closure. In the use of PRP in burns, second degree burns (SD), second degree burns with induced diabetes mellitus (SDD) and third degree burns (TD) were evaluated. Ninety animals were divided into three groups (SD, SDD, and TD) and in each one 10 animals were treated, 10 animals served as controls, and 10 animals were used for PRP preparation. The wound areas were accompanied until the twenty-first day, when the animals were killed and skin biopsies were obtained. The results of the validation of the model show that the burns derived from 60°C were of superficial SD (28% of the dermis involved); for 70 °C they were deep SD (72% of the dermis involved); and for 80°C they were TD (100% of the dermis involved). Regarding the use of PRP in burns, it was observed that in the SD and SDD treated groups the wound closure was accelerated and there was reduction in the number of CD31, CD163, CD68, MPO, and TGF- β positive cells, and increasing of the number of MMP2 positive cells. The neoepidermis was thinner in control of both SD and SDD groups, and the granulation tissue was reduced in both control SDD and TD. The model used is safe and reliable to produce regular and uniform burns of varying diameters, by its ability of the fine control of temperature, by the animal positioning, and by its reproducibility. PRP appears to accelerate the healing of burns of SD and SDD, but not TD.

Keywords: Platelet-rich plasma. Burns. Healing. Experimental model. Rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fases da cicatrização.....	16
Figura 2	Profundidade da queimadura.....	23
Figura 3	Resposta local à queimadura.....	24
Figura 4	Preparo do plasma rico em plaquetas.....	28
Figura 5	Esquema da distribuição de grupos para a criação de queimaduras de tamanhos e profundidades padronizados.	33
Figura 6	Desenho esquemático do equipamento desenvolvido para a produção de queimaduras nos ratos.....	34
Figura 7	Fotografia do equipamento.....	35
Figura 8	Posição dos animais submetidos a queimaduras.....	36
Figura 9	Momento da queimadura.....	37
Figura 10	Esquema da distribuição de grupos e subgrupos de ratos para a utilização de plasma rico em plaquetas em queimaduras.....	39
Figura 11	Curativo após a produção de queimadura.....	41
Figura 12	Análise das queimaduras.....	46
Gráfico 1	Porcentagem da ferida original.....	46
Gráfico 2	Avaliação da profundidade da queimadura.....	47
Gráfico 3	Avaliação da massa corporal dos grupos de ratos.....	48
Gráfico 4	Contagem de plaquetas.....	48
Figura 13	Avaliação macroscópica da ferida.....	49
Figura 14	Avaliação microscópica das queimaduras.....	50
Gráfico 5	Análise imuno-histoquímica dos grupos de ratos quanto a presença de células.....	52
Figura 15	Painel imuno-histoquímico para células CD31+.....	53
Figura 16	Painel imuno-histoquímico para células CD163+.....	53
Figura 17	Painel imuno-histoquímico para células CD68+.....	54
Figura 18	Painel imuno-histoquímico para células MPO+.....	54
Figura 19	Painel imuno-histoquímico para células TGF- β +.....	55
Figura 20	Painel imuno-histoquímico para células MMP-2+.....	55
Tabela 1	Quantificação da hidroxiprolina (ng/mg).....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CGRP	Calcitonina gene relacionado
CH	Cicatrizes hipertróficas
CK15	Cytokeratin-15
D	Dia
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
FC	Fatores de crescimento
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
IFN- γ	Interferon γ
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IL	Interleucina
LCE	Laboratório de Cirurgia Experimental
LPS	Lipopolissacarídeos
LTR	Laboratório de Reparo Tecidual
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
Pan-CK	<i>Cytokeratinpanantibody</i>
PDAF	Fator angiogênico derivado de plaquetas
PDEGF	Fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	Primeiro grau
pH	Potencial hidrogeniônico
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
QG	Quarto grau

RECK	Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs
SCQ	Superfície corporal queimada
SG	Segundo grau
SGD	Segundo grau associado a diabetes <i>mellitus</i>
TG	Terceiro grau
TGF- β	Fator de crescimento transformante β
TIMP	Inibidores tissulares das MMP
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1	Processo de cicatrização.....	15
1.2	Cicatrização no diabetes <i>mellitus</i>.....	20
1.3	Queimaduras.....	21
1.4	Modelos experimentais de queimaduras.....	25
1.5	Plasma rico em plaquetas.....	26
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
4	MÉTODO.....	32
4.1	Descrição de um modelo experimental para a criação de queimaduras de tamanho e profundidade padronizadas.....	32
4.1.1	<u>Animais.....</u>	32
4.1.2	<u>Equipamento experimental de queimadura.....</u>	33
4.1.3	<u>Técnica de queimadura.....</u>	34
4.1.4	<u>Análise macroscópica.....</u>	36
4.1.5	<u>Análise microscópica.....</u>	37
4.1.6	<u>Análise estatística.....</u>	38
4.2	Utilização de plasma rico em plaqueta em queimaduras.....	38
4.2.1	<u>Animais.....</u>	38
4.2.2	<u>Preparação do PRP.....</u>	38
4.2.3	<u>Contagem plaquetária.....</u>	39
4.2.4	<u>Indução do diabetes <i>mellitus</i>.....</u>	40
4.2.5	<u>Queimadura.....</u>	40
4.2.6	<u>Análise macroscópica.....</u>	41
4.2.7	<u>Coleta de material e análise microscópica.....</u>	42
4.2.8	<u>Imuno-histoquímica e quantificações.....</u>	42
4.2.9	<u>Análise bioquímica.....</u>	43
4.2.10	<u>Análise estatística.....</u>	44
5	RESULTADOS.....	45

5.1	Modelo para a criação de queimaduras de tamanho e profundidade padronizadas	45
5.1.1	<u>Avaliação macroscópica</u>	45
5.1.2	<u>Avaliação microscópica</u>	45
5.2	Uso de plasma rico em plaquetas em queimaduras	47
5.2.1	<u>Peso e glicemia</u>	47
5.2.2	<u>Contagem de plaquetas</u>	47
5.2.3	<u>Análise macroscópica</u>	49
5.2.4	<u>Análise microscópica</u>	50
5.2.5	<u>Imuno-histoquímica</u>	51
5.2.6	<u>Depósito de colágeno</u>	56
6	DISCUSSÃO	57
	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	75

INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo que visa à sobrevivência do indivíduo, muitas vezes sacrificando a estética e funcionalidade, no intuito de assegurar o fechamento completo das lesões.¹ Este processo envolve inúmeros componentes, como células, mediadores e a matriz extracelular (MEC) que interagem para que ocorra a restauração do tecido lesionado, sofrendo influência direta de inúmeros fatores.

Existem diversas situações patológicas que alteram a cicatrização, sendo duas delas notórias: o paciente queimado e o diabetes *mellitus* (DM). Cada uma destas possui mecanismos distintos que interferem na cicatrização de forma global, causando alterações de morbidade e, em alguns casos, levando à morte dos pacientes.

Pacientes com DM apresentam alteração em todas as fases da cicatrização, sendo sugerido que existam mais de 100 fatores fisiológicos que contribuam para a cicatrização deficiente.²⁻⁶

Estudos iniciais sobre queimaduras focavam no entendimento da fisiopatologia para reduzir as taxas de mortalidade. Nos anos 1940, apontam que a principal causa da morte do grande queimado era choque hipovolêmico ou insuficiência renal pré-renal, mas, hoje, com o conhecimento adquirido sobre alterações vasculares, deslocamento de fluidos e técnicas de ressuscitação, houve drásticas reduções na mortalidade das fases iniciais do trauma.⁷⁻⁹ Entretanto, a incidência, tratamento e prevenção de cicatrizes patológicas não acompanharam os avanços obtidos na sobrevida.¹⁰

Recentemente, o foco das investigações voltou-se para a minimização da morbidade e para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes que sobrevivem.^{11,12} Tempo de tratamento prolongado e complicações secundárias causadas em decorrência de feridas não cicatrizadas motivam pesquisadores a procurarem métodos para acelerar a cicatrização e reepitelização desses pacientes, reduzindo as complicações.¹³

Alterações estéticas e dificuldades na cicatrização constituem a rotina nos pacientes grande queimados. Estas feridas crônicas apresentam grande impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes e custo para o sistema de saúde, e, por isso, pesquisas visando à manipulação da cicatrização têm sido, cada vez mais, desenvolvidas.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas que permite aplicação de grandes quantidades de fatores de crescimento (FC) de forma localizada, levando a efeitos positivos sobre diversas fases da cicatrização.^{14,15} Os potenciais benefícios induzidos

pelos FCs contidos no PRP, aliado ao fato de serem obtidos de forma endógena e em associação ao baixo custo de produção, são grandes atrativos desse produto em comparação a produtos sintéticos.

Sabendo-se das grandes alterações induzidas pela cicatrização nos pacientes queimados e naqueles com DM, e dos possíveis benefícios advindos do PRP, este trabalho consiste na sua aplicação sobre queimaduras induzidas em ratos. Optou-se por queimaduras de segundo grau profundo (SD), queimaduras de segundo grau profundo associadas a diabetes *mellitus* (SGD) e queimaduras de terceiro grau (TD), todas elas sendo comparadas com queimaduras de mesmo nível, em animais-controle.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Processo de cicatrização

De forma didática, o processo da cicatrização pode ser dividido em três fases: inflamatória, proliferativa (epitelização, granulação e angiogênese) e remodelação. Contudo, é importante notar que essas fases não são sequenciais, ao contrário, elas se sobrepõem, ocorrendo simultaneamente. Como acontece em outros eventos celulares, existe grande redundância de sinais e comunicações celulares que, apesar de benéficas, dificultam o entendimento geral dos fenômenos da cicatrização.¹⁶ (Figura 1)

A fase inflamatória inicia-se com a lesão vascular e exposição da membrana basal do endotélio, levando a vasoconstrição temporária, que dura entre cinco a dez minutos, sendo capaz de ocluir completamente vasos de até 5 mm.¹⁷ Simultaneamente, ativa-se a cascata de coagulação, tanto por sua via intrínseca como pela extrínseca, no intuito de formar um coágulo, assegurando a hemóstasia e servindo de MEC provisória para migração celular, pois o coágulo possui proteínas de adesão, como fibrina, vitronectina e fibronectina.¹⁸ A trombina é responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina e promove a agregação plaquetária, além de estimular células endoteliais e monócitos a liberarem citocinas inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ).¹⁹

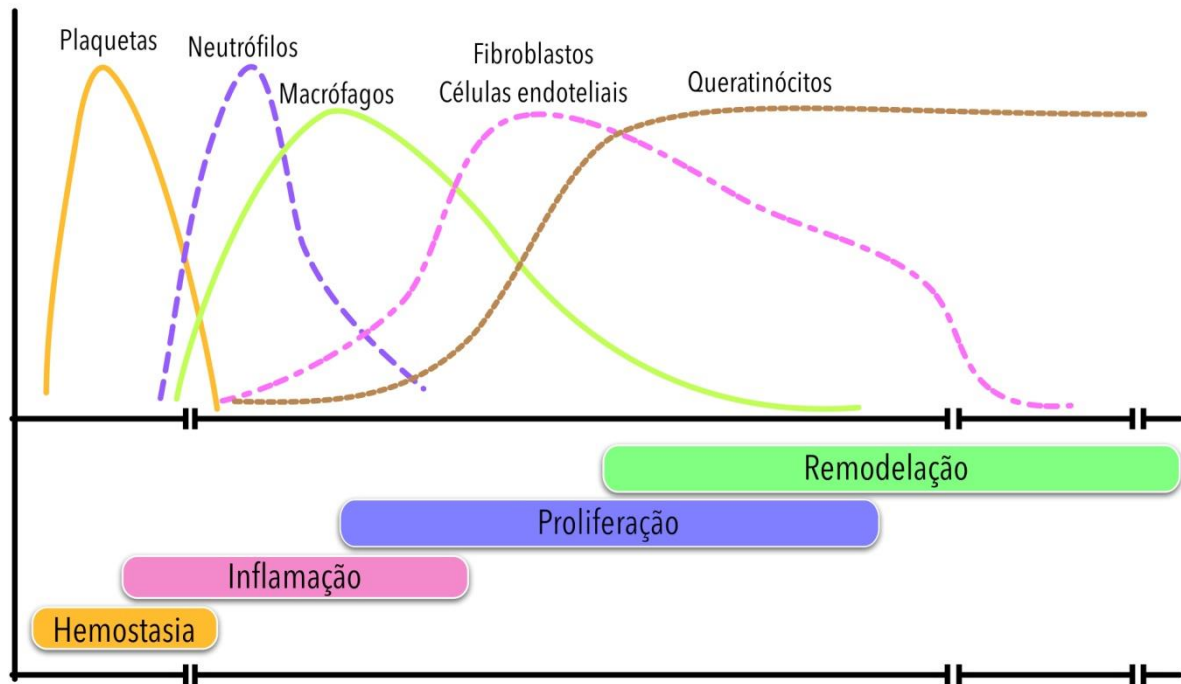
As plaquetas ativadas, através dos alfa grânulos, secretam diversos FC. Estes se ligam a receptores transmembranares celulares, ativando proteínas sinalizadoras endógenas e iniciando a expressão de sequências genéticas normais que são responsáveis pela proliferação, mitose e quimiotaxia celular, formação de MEC, síntese de colágeno e angiogênese, todos elementos essenciais para o processo de cicatrização.¹⁴

Após o breve período de vasoconstrição, ocorre vasodilatação mediada por histamina, leucotrienos e prostaglandinas, associada ao aumento da permeabilidade capilar, o que permite a entrada das células inflamatórias no local da lesão.²⁰ A fase inflamatória pode ser dividida em precoce, com recrutamento de neutrófilos, e tardia, com aparecimento e transformação de monócitos.¹⁸

Alguns minutos após o trauma, neutrófilos infiltram a ferida e iniciam a limpeza de debris e bactérias por fagocitose e permanecem por dois a cinco dias na ferida. Os neutrófilos têm dois mecanismos básicos para destruir debris e bactérias: primeiramente, por ingestão direta e destruição, por meio da fagocitose, e, depois, por degranulação e liberação de

substâncias tóxicas, como elastase e proteases, atuando sobre bactérias e tecido desvitalizado.¹⁷

Figura 1 – Fases da cicatrização



Legenda: A parte superior refere-se à cinética da migração celular e a inferior à evolução temporal das fases da cicatrização.

Fonte: Modificado de PENCE & WOODS, 2014

Subsequentemente, os neutrófilos são substituídos por monócitos, atraídos por mediadores quimiotáticos, se transformam em macrófagos ativos que, associados a macrófagos residentes, são responsáveis por continuar a limpeza de debris e bactérias, e pela produção de mais FC.¹ Não se diferencia a função dos macrófagos residentes do tecido dos macrófagos derivados dos monócitos na cicatrização, mas existe evidência da cooperação entre esses dois tipos.²¹

A permanência prolongada de neutrófilos é deletéria, pois eles produzem níveis elevados de proteases e radicais livres que podem afetar o tecido viável e FC.²² Um neutrófilo pode fagocitar aproximadamente 20 bactérias, sendo desativado e morto após isso.²³ Esta apoptose, que é induzida pelos macrófagos, é essencial. Porém, tem-se que observar que os restos celulares de neutrófilos mortos podem afetar a cicatrização. Por isso, macrófagos realizam a fagocitose desses restos, em um processo denominado de eferocitose.^{22,24} Como este processo apresenta efeito anti-inflamatório sobre os macrófagos, a permanência excessiva ou ausência dos neutrófilos pode prolongar a fase pró-inflamatória.²¹

Os macrófagos são essenciais, tanto na fase inflamatória quanto na proliferativa. Experimentos mostram que a sua supressão temporal leva a efeitos distintos. Quando ausentes na fase inflamatória, há retardo na cicatrização e redução na formação de tecido de granulação e na reepitelização. A sua ausência na fase proliferativa está associada a sangramentos, colapso na rede de neovascularização em formação e retardo na cicatrização e maturação. Quando supridos na fase de maturação, não se observa alteração na cicatrização.²⁴

Macrófagos *in vitro*, estimulados por diferentes fatores, mostram diferentes fenótipos. A forma "clássica de ativação" ocorre pela exposição a restos bacterianos, TNF- α ou IFN- γ e produz macrófagos denominados pró-inflamatórios ou M1. Já a forma "alternativa de ativação" produz três subtipos, denominados de M2a, b ou c, por exposição a IL-4 e IL-13 (M2a), complexo imune da imunoglobulina G (IgG) associado a lipopolissacarídeos (LPS) (M2b) ou IL-10 e glicocorticoides (M2c). Os macrófagos M1 são pró-inflamatórios, enquanto os M2 são anti-inflamatórios. Isso explica por que os primeiros são mais prevalentes na fase inicial e, os últimos, nas fases tardias da cicatrização.^{25,26} Essa divisão não se aplica *in vivo*, pois os diferentes fatores de estimulação dos fenótipos estão presentes ao mesmo tempo e é mais provável que haja migração do tipo M1 para M2 durante a fase avançada da cicatrização.^{27,28}

No quarto dia, inicia-se o depósito de tecido de granulação, que é formado por material depositado pelos fibroblastos e por pequenos vasos sanguíneos. A MEC é uma trama de proteínas fibrosas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos que apresenta importante função na cicatrização.²⁹ A matriz serve como arcabouço para a migração celular e os vasos nela contidos nutrem as células envolvidas. Fatores de crescimento são essenciais nesta fase, como fator de crescimento transformante β (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), produzidos por macrófagos, que estimulam a proliferação e migração de fibroblastos responsáveis pela produção de colágeno, fibronectina e proteoglicanos. Inicialmente, ocorre depósito de colágeno tipo III, uma proteína estrutural mais fraca, mas que pode ser produzida rapidamente, e, finalmente, ocorre o depósito do colágeno tipo I, que é mais resistente.¹⁹

A MEC não é inerte, haja visto que possui efeito sobre as células nela presentes, por meio de um processo chamado de "reciprocidade dinâmica". A MEC afeta células que, por sua vez, alteram a composição do MEC, mediante a síntese ou degradação dos seus componentes, que novamente atuam sobre as células. A comunicação ocorre por meio das integrinas, que são receptores transmembrana que possuem uma porção extracelular que interage com a MEC, e a uma porção intracelular que interage com proteínas de sinalização.³⁰

O processo de reepitelização ocorre entre três e dez dias, e consiste em cobrir áreas epiteliais desnudas, somente se encerrando após cobertura total e restabelecimento da barreira cutânea. A reepitelização dá-se a partir de queratinócitos presentes na borda da ferida e apêndices cutâneos e de células-tronco epidérmicas, também presentes nos apêndices cutâneos.³¹

Para permitir a migração, as células epiteliais retraem suas tonofibrilas (conexões entre citoplasmas celulares), perdem suas aderências intercelulares (desmossomos) e a membrana basal (hemidesmossomas), por ação de enzimas proteolíticas dependentes de zinco, denominadas de metaloproteínases de matriz (MMP), e da plasmina (derivado do plasminogênio). Em seguida, as células modificam sua forma, tornando-se achatadas e alongadas, desenvolvendo filamentos citoplasmáticos de actina e integrinas na superfície celular, no intuito de migrar.³²

Ao contrário das células mesenquimais e endoteliais, que migram através da matriz tridimensional, os queratinócitos polarizados migram sobre o recém-formado tecido de granulação, entre o tecido e a escara, dissecando esse espaço.³⁰ Os fatores mais importantes para proliferação e migração epitelial são a ausência de uma célula vizinha (borda livre) e os FCs, tais como TGF- α , TGF- β e fator de crescimento epidermal (EGF).^{20,33} O EGF e TGF- α são mais importantes para a proliferação de queratinócitos, e o TGF- β para a migração. O TGF- β é produzido por macrófagos, fibroblastos e queratinócitos, sendo liberado na sua forma inativa (pró-TGF- β), necessitando de clivagem protéica para ativação, que pode ser temporal. Logo após o trauma, as plaquetas seriam as responsáveis pela liberação do TGF- β , mas apenas parte seria ativada imediatamente, sendo a maioria ativada no início da epitelização, denotando latência entre a liberação e sua ativação.³³ As principais funções são proliferação e migração de células epiteliais, quimiotaxia de células endoteliais, controle de apoptose celular e transformação de fibroblastos em miofibroblastos.¹⁰

As células epiteliais encerram sua migração ao entrarem em contato com outras células epiteliais (inibição de contato). Após isso, reestabelecem suas aderências com a membrana basal e entre si, e iniciam a fase de proliferação e maturação, produzindo as camadas estratificadas da pele normal.³²

A angiogênese é um processo dinâmico, no qual surge a formação de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos preexistentes, e é essencial para o fornecimento de nutrientes ao tecido de cicatrização, além de permitir a entrada de células da cicatrização no local da lesão.^{34,35} A angiogênese inicia-se no terceiro dia e atinge seu pico no décimo dia. Os fatores estimulantes para a sua ocorrência são níveis baixos de oxigênio (o mais potente),³⁶ ausência

de células endoteliais vizinhas (similar à epitelização), acidose láctica e FCs, como TGF- β , fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), angiopoietina e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O bFGF apresenta maior importância nos primeiros três dias da cicatrização e, o VEGF, a partir do quarto dia.^{18,36,37} O VEGF é o fator pró-angiogênico mais relevante, sendo produzido por macrófagos e queratinócitos, possuindo seis isoformas, todas com efeitos similares. No entanto, seu modo de ligação com a MEC, dependendo do número de aminoácidos presentes, seus efeitos principais são proliferação e migração das células endoteliais, e aumento da permeabilidade vascular.³⁴

A angiopoietina apresenta efeito proliferativo, estimulando a migração das células endoteliais e também exibe efeito sinérgico, porém distinto do VEGF. O FCF, que pode ser produzido por células inflamatórias, células endoteliais e fibroblastos, tem 23 isoformas, dentre elas o FGF-1 (FGF ácido) e, em especial, o FGF-2 (bFGF), que são responsáveis pela angiogênese. O TGF- β , estimula a migração e a diferenciação de células endoteliais, e a formação de túbulos vasculares na angiogênese.³⁸

A formação de vasos inicia-se pela ligação do FC a células endoteliais da microvascularização de vasos lesionados. Estes secretam enzimas proteolíticas, especialmente a MMP9, que dissolvem a camada basal, permitindo a proliferação e migração das células endoteliais.³⁹ As MMPs, além de sua ação local, também apresentam efeito quimiotático para células endotéliais, sendo sua ausência ou superprodução deletéria para a angiogênese.³⁶ Os brotos vasculares formam canais tubulares que se interconectam e se diferenciam em artérias ou veias. Os brotos, contudo, não têm a habilidade de reconhecer, encontrar e fundir com outros brotos, sendo essa função orquestrada por macrófagos M2.¹⁹

A remodelação é a última fase da cicatrização, podendo durar semanas ou meses. Nesta fase, há redução da proliferação celular e da síntese protéica, apoptose de fibroblastos e células endoteliais, estabelecendo-se equilíbrio entre a produção e degradação de colágeno. Nesse momento, a ferida já está fechada, porém a organização tecidual é de baixa qualidade, com o colágeno sendo disposto de forma paralela, ao invés de entrelaçado, como ocorre na pele normal.¹⁶

Na fase de remodelação, a degradação é realizada por MMPs, que possuem atividade em todas as fases da cicatrização. Na fase inflamatória, são secretados MMPs por células inflamatórias para realizar desbridamento de tecido lesionado pelo trauma. Na angiogênese, células endoteliais secretam MMPs, no intuito de erodir a membrana basal e produzir "buracos" por onde células endoteliais possam migrar, enquanto miofibroblastos secretam MMPs para facilitar a contração da ferida.⁴⁰ Células epiteliais secretam MMPs para facilitar a

sua migração entre o tecido viável e a escara da ferida.⁴⁰ Fibroblastos secretam MMPs na fase de remodelação para remover a MEC irregular e degradar colágeno, estabelecendo um equilíbrio entre produção e degradação,⁴⁰ e regulando a sinalização célula-célula e célula-matriz, por ativarem ou desligarem citocinas e fatores de crescimento, ou por modificarem receptores de superfície celular.⁴¹

A expressão e ativação das MMPs são confinadas a locais e estágios específicos dentro da cicatrização.⁴¹ As MMPs são inativadas por inibidores tissulares das MMPs (TIMPs), estes sendo representados por quatro subtipos.⁴¹ Outro inibidor endógeno dos MMPs é o RECK (*reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs*), mas este apresenta baixa potência em relação a TIMPs.⁴¹ Níveis excessivos de proteinases estão relacionados a retardo da cicatrização e a deiscência de feridas cirúrgicas, por destruição não programada da MEC, de receptores de superfície celular e de FC.⁴⁰

Alguns fibroblastos, por ação em especial do TGF- β , se transformam em miofibroblastos, que possuem depósitos de actina no seu citoplasma e são responsáveis pela contração da ferida, diminuindo a superfície total e facilitando a epitelização.³⁸ Ao final de todo processo, tem-se uma cicatriz madura que se caracteriza por ser acelular e avascular, e com substituição do colágeno tipo III pelo tipo I.¹⁸

1.2. Cicatrização no diabetes *mellitus*

O DM acomete entre 2% a 5% da população, estimando-se que esse número possa chegar a 7,7%, em 2030.²⁵ DM é uma desordem metabólica, levando à hiperglicemia, por defeito na secreção de insulina (DM tipo I) ou por resistência periférica tecidual (DM tipo II), sendo esta última a forma mais prevalente.²⁵ A história natural do DM é acompanhada tanto por lesões microscópicas quanto macroscópicas, dentre estas incluindo-se lesões nervosas e vasculares.¹⁷

A neuropatia diabética está associada à redução de neuropeptídeos, como substância P e calcitonina gene relacionado (CGRP), cuja função seria vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular, além de se comportarem como quimiotáticos para neutrófilos e estimularem a proliferação de células endoteliais e queratinócitos.⁴²

A vasculopatia diabética afeta tanto a macro quanto a microcirculação. Na macrocirculação, ocorre aumento de fatores pró-trombóticos e redução da formação de

circulação colateral. Já na microcirculação, há redução do aporte sanguíneo, reduzindo-se a oferta de nutrientes e de células de defesa.⁴² Outro fato observado é que as hemácias de pacientes diabéticos são menos maleáveis, devido ao aumento da viscosidade, o que reduz a sua capacidade de passagem pela microcirculação.³

Na cicatrização em pacientes diabéticos, observa-se fase inflamatória prolongada, com redução nos níveis de FCs, deficiência do sistema imune, diminuição da função dos granulócitos, redução da angiogênese, em especial pela redução do VEGF, alteração na síntese de colágeno, níveis reduzidos de fibronectina, redução da migração e proliferação de fibroblastos, redução do número de miofibroblastos e aumento da atividade de proteases.^{1-3,22,26,43,44}

Esse prolongamento da fase inflamatória pode ser explicado, em parte, pelo seguinte fenômeno: após concluírem sua função, os neutrófilos sofrem apoptose, porém os restos de neutrófilos precisam ser fagocitados pelos macrófagos. Este evento apresenta um efeito anti-inflamatório sobre a cicatrização. Contudo, em pacientes diabéticos, observam-se níveis elevados de apoptose associados à deficiência de fagocitose dos macrófagos, reduzindo o efeito anti-inflamatório desse fenômeno.²²

Diabéticos apresentam aumento de até cinco a dez vezes dos níveis de MMPs e redução de 55 vezes dos níveis de TIMPS, em relação a pacientes normais, o que facilita a degradação, não só do colágeno, mas, também, da própria MEC e FC.^{22,45} A degradação da MEC reduz os locais para as células da cicatrização aderirem e interfere na sinalização para elas migrarem, diferenciarem e proliferarem.³⁰

Em ratos com diabetes, a utilização de PRP pode ser benéfica na cicatrização. Estudo avaliando feridas excisionais de pele total em ratos com diabetes induzido mostram níveis reduzidos de FCs e retardo na cicatrização, quando comparado com ratos normais, porém a aplicação de PRP eleva os níveis de alguns fatores de crescimento, melhorando a cicatrização nesses animais.⁴⁶

1.3. Queimaduras

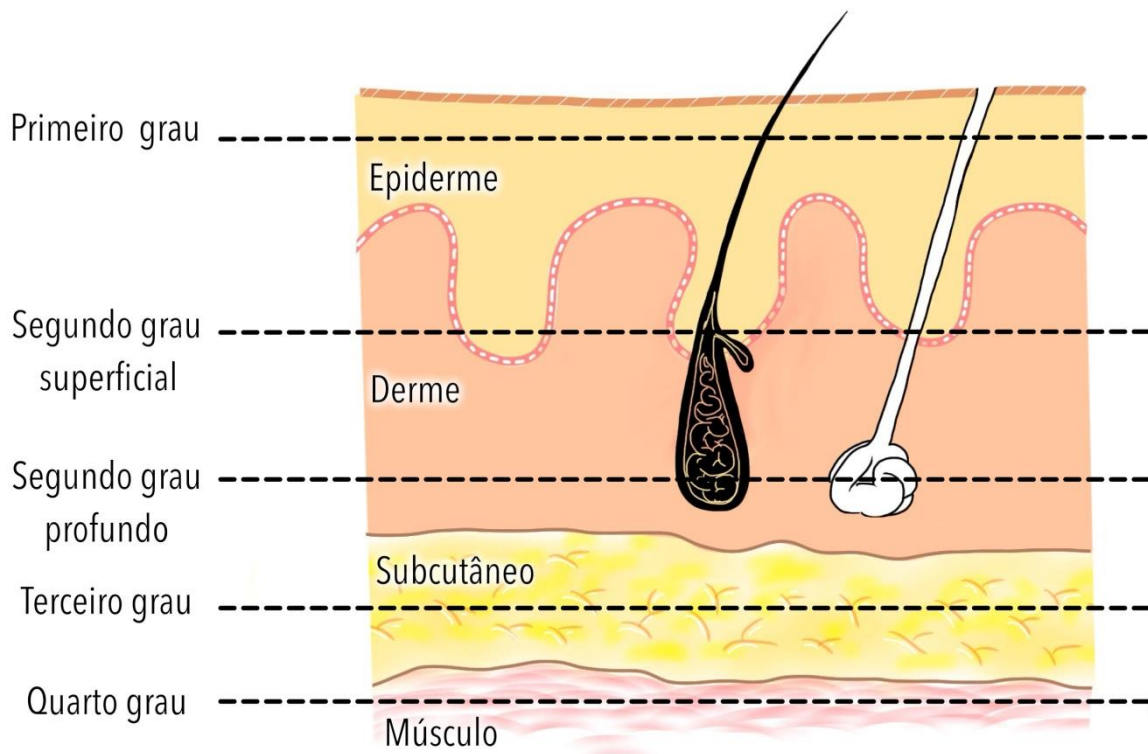
Queimaduras podem ser definidas como lesões térmicas, elétricas ou químicas de tecidos, sendo que as térmicas ainda podem ser divididas em chama, frio e contato com líquidos ou sólidos aquecidos.⁴⁷ Só nos Estados Unidos, todos os anos, 450.000 pacientes

recebem atendimento médico relativo a queimaduras, o que resulta em 40.000 internações hospitalares e 3.500 mortes.⁴⁸ Queimaduras representam uma entidade peculiar, apresentando dificuldades desde sua avaliação e conduta até a tendência de produção de cicatrizes patológicas.⁴⁹

As queimaduras podem ser classicamente divididas em primeiro grau (PG), segundo grau (SG) e terceiro grau (TG), dependendo da profundidade da lesão. As queimaduras de PG se restringem à epiderme e apresentam eritema doloroso (terminações nervosas intactas), com ausência de bolhas ou flictenas. Geralmente, cicatrizam em sete dias, sem deixar qualquer sinal. As queimaduras de SG caracterizam-se pela presença de bolhas, podendo ser subdivididas em superficial ou profunda. A primeira envolve a porção superior da derme e, a segunda, quase a sua totalidade. As SG superficiais são mais dolorosas que as SG profundas, com a derme avermelhada e o enchimento capilar preservado, e geralmente cicatrizam sem sequelas. Já as SG profundas, são mosqueadas ou esbranquiçadas, com ausência de enchimento capilar. As superficiais cicatrizam em torno de 14 dias e as profundas em 21 a 35 dias. Nas lesões de SG, os anexos cutâneos são preservados e as células epiteliais presentes auxiliam na epitelização da ferida. As lesões de TG são indolores (destruição das terminações nervosas), secas, com aspecto esbranquiçado ou enegrecidas, com perda da elasticidade. Também é característica desta lesão a destruição de apêndices cutâneos, com o tempo de cicatrização podendo levar meses.⁵⁰⁻⁵² Alguns autores ainda classificam as queimaduras em um grau adicional, em quarto grau (QG), quando a lesão afeta tecidos ou órgãos abaixo da pele, como músculo ou osso.⁵³ (Figura 2)

Queimaduras ainda podem ser classificadas em relação à resposta local. Esta classificação é uma representação tridimensional da lesão, onde a zona central é chamada de zona de coagulação e representa o local de maior dano, com destruição irreversível das células causada pela coagulação e a desnaturação das proteínas celulares. A zona intermediária é denominada de zona de estase, que representa uma zona de alteração de perfusão tecidual. Esta zona, se não tratada, pode evoluir para a necrose. A zona mais periférica é a zona de hiperemia, onde ocorre aumento da perfusão vascular, sem risco de evoluir para necrose.^{52,54} (Figura 3) A conversão da queimadura refere-se à extensão da ferida após o trauma inicial, podendo ser induzida com choque hipovolêmico, edema intersticial comprimindo microvascularização, infecção local e produção de radicais livres.⁴⁹

Figura 2 – Profundidade da queimadura



Legenda: Primeiro grau: atinge apenas epiderme; segundo grau superficial: afeta derme superficial; segundo grau profundo: afeta quase a totalidade da derme; terceiro grau: afeta a totalidade da derme; quarto grau: afeta músculo ou osso.

Fonte: Modificado de JESCHKE *et al.*, 2012

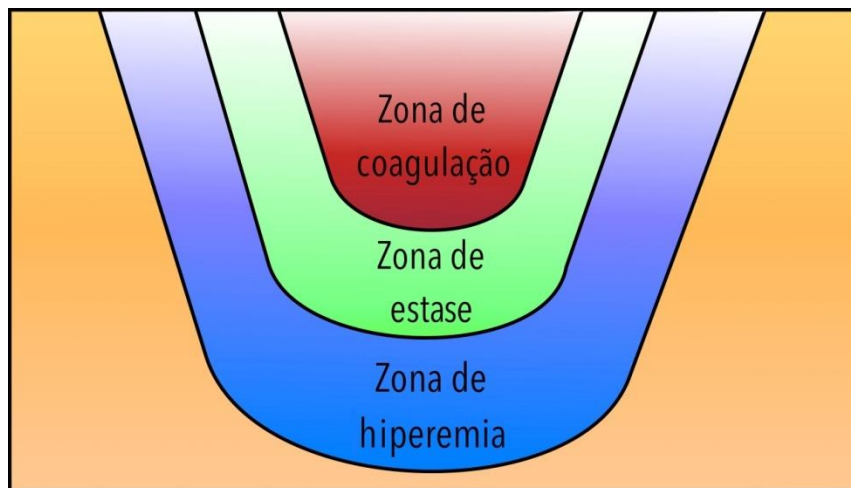
A resposta sistêmica ocorre inicialmente pelo próprio dano cutâneo, que permite entrada de bactérias e perda de calor e líquido para o meio ambiente. O tecido danificado libera mediadores vasoativos, como cininas, prostaglandinas e catecolaminas, o que causa aumento da permeabilidade capilar e deslocamento maciço de fluidos do intravascular para o interstício culminado em choque hipovolêmico. Associado a isso, pacientes queimados também apresentam grande supressão do sistema imune.¹²

As fases da cicatrização do paciente queimado possuem algumas peculiaridades. Inicialmente a fase inflamatória é prolongada em relação à cicatrização normal. Há níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, histamina e radicais livres, levando ao aumento da permeabilidade vascular e do edema intersticial.⁵⁶ O PDGF está presente em níveis mais elevados nas cicatrizes de queimados e leva ao aumento da proliferação de fibroblastos, do depósito excessivo de colágeno e da transformação de fibroblastos em miofibroblastos.⁵⁶

Na fase proliferativa, há aumento do depósito de MEC, que é diretamente proporcional ao grau de retardo da epitelização. TGF- β tem papel importante nesta fase, estando sua expressão aumentada e, paralelamente, ocorre redução do decorin, um

proteoglicano que se liga ao TGF- β , causando sua inativação. O TGF- β é produzido pelos fibroblastos, o que aumenta a transformação de fibroblastos em miofibroblastos e inibe a epitelização.^{10,44,57,58} O fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) também tem expressão elevada nos pacientes queimados, induzindo o depósito de colágeno com redução da sua degradação.⁴⁴

Figura 3 – Resposta local à queimadura



Legenda: Zona de coagulação (central) – necrose tecidual; Zona de estase (intermediária) – alteração de perfusão; Zona de hiperemia (periférica) – vasodilatação e hiperemia.

Fonte: Modificado de JESCHKE *et al.*, 2012

Fibroblastos nas porções superficiais da derme são diferentes dos da região profunda. Essa diferença pode explicar a maior incidência de cicatrizes patológicas do queimado. A queimadura destrói os fibroblastos superficiais, deixando os profundos para repopular a ferida, estes produzem mais colágeno e menos decorin, além de causarem mais contração que os fibroblastos da superfície.^{44,56} Os miofibroblastos, que nas queimaduras têm apoptose reduzida, seriam responsáveis pela contratura patológica da ferida, que é definida como encurtamento ou retração da pele, afetando a estética e a função.¹¹

Na fase de maturação, ocorrem níveis elevados de TIMP em relação a MMP, o que reduziria a degradação da MEC e seus componentes.¹¹

As modificações observadas nas cicatrizações acima citadas levam a alta prevalência de cicatrizes hipertróficas (CH). Estudos mostram incidência de 77% de cicatrizes hipertróficas no primeiro ano após completa cicatrização da queimadura. Porém, a grande maioria regride em até dois anos, com cerca de até 25% dos pacientes permanecendo, indefinidamente, com as lesões.¹¹

1.4. Modelos experimentais de queimaduras

Modelos experimentais são essenciais para testar terapias antes de sua aplicabilidade clínica. No caso de modelos de queimaduras, é primordial que estes sejam previsíveis, uniformes e reprodutíveis. A profundidade de uma queimadura, que é um dos principais determinantes de prognóstico, é produzida por três elementos: temperatura, tempo de exposição e pressão de contato.^{50,59-61}

Quanto maior a temperatura, a pressão e o tempo de exposição, maior a profundidade da lesão obtida. Devido a isso, o controle preciso desses parâmetros deve se constituir no objetivo de qualquer modelo experimental.⁶²

Os modelos mais comuns são os de queimadura por contato ou escaldadura.^{60,63-68} As queimaduras de contato são induzidas por aquecimento de uma barra metálica em banho-maria, com temperatura predeterminada e aplicada à pele pelo tempo programado.^{60,64,65} Neste modelo, não é possível determinar a temperatura exata da barra de ferro ou quanto tempo é necessário ficar em imersão para que a temperatura seja estabilizada.⁵⁹ Existem, ainda, dois pontos importantes a serem observados: primeiro, o vapor d'água presente na superfície da barra pode impedir contato completo com a pele, levando à produção de "pontos frios", criando uma queimadura irregular.⁶⁹ O segundo ponto é que, nesse modelo, a pressão aplicada é imprevisível e irregular, impedindo a reprodutibilidade do método.⁵⁹

Já os modelos de escaldadura utilizam um molde com uma abertura de área conhecida, onde parte do corpo do animal fica exposto, sendo imersa em banho d'água com temperatura controlada pelo tempo desejado.^{63,66-68} Estes modelos são trabalhosos e podem necessitar até de três pessoas para realizar a queimadura,⁶⁶ além de expor a equipe a riscos durante o procedimento.⁶⁰ Um ponto a ser observado nesses modelos é a necessidade de um selo d'água perfeito, que evita que o líquido quente escorra entre o molde e a pele, o que levaria a um aumento da área queimada acima do programado.^{68,70}

A lesão por escaldadura leva mais tempo para determinar a sua profundidade final em relação aos modelos de contato, pois, no caso, a queimadura por contato cria uma camada necrótica imediata que serve de isolante térmico e protege o plexo vascular profundo da derme, fato que não ocorre na escaldadura. As lesões que afetam esse plexo apresentam conversão da queimadura tardia pelo envolvimento vascular.⁶⁵

É importante que a área de pele seja suficientemente grande para permitir completo contato com o objeto aquecido^{60,61} e a pressão utilizada seja constante em todos os animais.⁷¹ Sem pressão uniforme, é impossível ter um modelo que seja reprodutível.^{69,71}

1.5. Plasma rico em plaquetas

PRP é definido como um concentrado autólogo de plaquetas em um pequeno volume de plasma, obtido pelo sequestro e concentração das plaquetas do sangue periférico, que é utilizado para acelerar a cicatrização.¹⁵ Essa biotecnologia funciona por meio da degranulação plaquetária, que é a liberação dos alfa grânulos, que contêm FC, pelas plaquetas ativas.^{14,72} O fundamento pelo qual o PRP melhora a cicatrização fundamenta-se na aplicação direta de níveis elevados de FC na ferida.

Apesar de FCs estarem presentes em pequenas quantidades, eles exercem uma influência poderosa na cicatrização e reparo.⁷³ Quando se compara o efeito do PRP com qualquer FC individual, este se mostra muito superior, confirmando um efeito sinérgico dos FCs presentes no PRP.^{74,75}

Plaquetas têm uma participação importante na cicatrização. Sua ativação ocorre quando, expostas ao colágeno e/ou à membrana basal de vasos lesionados, causam a formação de um coágulo e, em seguida, a liberação de FC por meio da degranulação (exocitose) dos alfa grânulos. Existem mais de 30 tipos conhecidos de FCs^{76,77} que atuam ao se ligarem a um receptor transmembrana presente na superfície celular, ativando proteínas sinalizadoras endógenas e iniciando a expressão de sequências genéticas normais, que são responsáveis pela proliferação, mitose e quimiotaxia celular, além da formação da MEC, síntese de colágeno e angiogênese, todos elementos essenciais para o processo de cicatrização.⁷⁸

Os FCs plaquetários mais conhecidos são: PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\alpha\beta$, PDGF $\beta\beta$, TGF- β 1, TGF- β 2, EGF, fator de crescimento epidermal derivado de plaquetas (PDEGF), FGF, fator angiogênico derivado de plaquetas (PDAF), VEGF e IGF-1.⁷⁹⁻⁸¹

PRP, além de apresentar aumento entre três e 30 vezes nos valores dos FCs em relação ao sangue periférico, ainda possui três proteínas de adesão: fibrina, fibronectina e vitronectina.^{15,82-84} A fibrina, além de ser uma proteína de adesão, ainda apresenta outras vantagens: ela promove hemostasia (atua como selante),¹³ serve para estabilizar material enxertado⁸⁵ e tem a habilidade de inibir crescimento bacteriano (ao menos *in vitro*).^{86,87}

PRP pode ser preparado por dois métodos distintos: separação celular por gradiente de densidade ou centrifugação diferencial. O primeiro utiliza grande volume de sangue (450 ml), necessita de acesso venoso profundo, utiliza equipamento especializado com um técnico qualificado e o sangue que não for aproveitado é autotransfundido. Por esses motivos, deve ser realizado em ambiente hospitalar, o que contribui para elevado custo.^{88,89} Já o segundo método, pode ser realizado com pequeno volume de sangue, em ambiente de consultório, com baixo custo e grande segurança, utilizando uma centrífuga de bancada⁹⁰ ou equipamento semi-automatizado produzido para esse propósito.⁷⁶

O preparo por centrifugação não eleva os níveis de P-selectina, que é marcador de degranulação plaquetária, mostrando que o PRP contém plaquetas íntegras.^{89,91} Outra característica vantajosa do PRP é o fato de ser autólogo. Como é preparado com sangue do próprio paciente, não existe risco de efeitos adversos ou transmissão de doenças, tais como HIV e hepatite.⁹²

A produção cuidadosa do PRP é essencial para seu sucesso. Para ser eficaz, é necessário que ocorra uma concentração mínima das plaquetas em relação ao sangue periférico. O valor ideal é um aumento entre quatro e cinco vezes dos níveis basais ou valores globais acima de 1.000.000 plaquetas/ μ L.¹⁴

No que se refere ao preparo, deve-se levar em conta o anticoagulante utilizado, o material de tubo de ensaio, o número total de ciclos, a força gravitacional de cada ciclo e o modo de ativação.⁹³⁻⁹⁵

Os anticoagulantes utilizados podem ser citrato de sódio ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Este último, apesar de mostrar número absoluto maior de plaquetas, está associado a dano plaquetário.⁹⁰ Tubos de ensaio de vidro podem ativar a cascata de coagulação, por isso devem ser utilizados tubos plásticos industriais siliconizados.^{92,96}

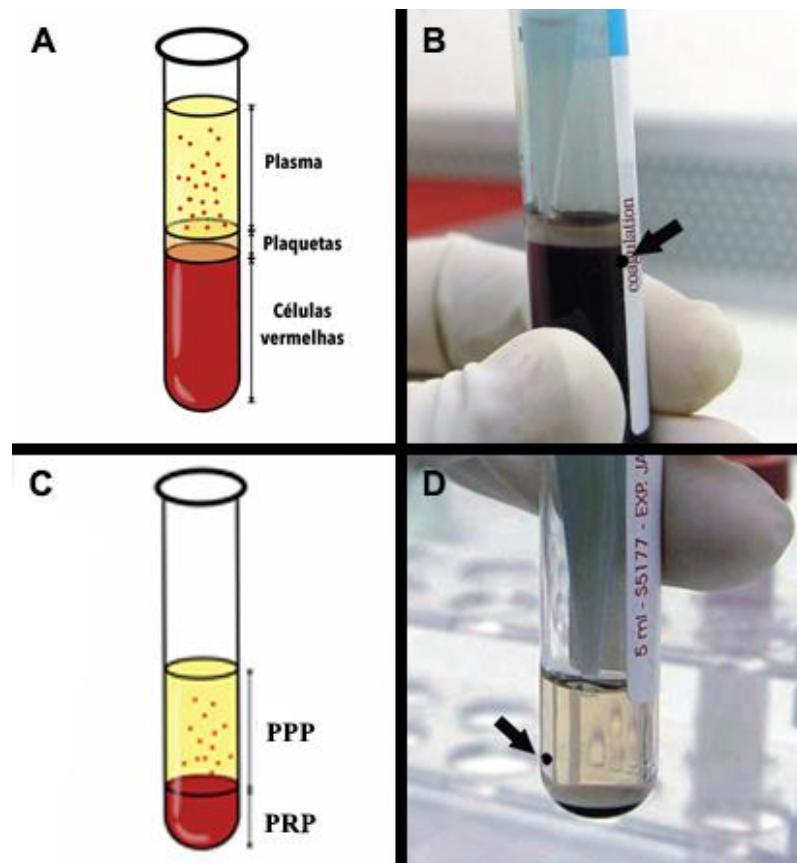
Em relação ao número de ciclos, os protocolos de ciclo único de centrifugação não produzem PRP, mas sim uma mistura de PPP e PRP que apresenta baixas concentrações plaquetárias. A obtenção de PRP por meio de ciclo único não é possível, independentemente da força ou tempo utilizado, pois as hemácias interferem na separação plaquetária.^{15,94,97} Num estudo comparativo entre ciclo único ou duplo, o aumento das plaquetas no ciclo único foi de 180% e no duplo 447%, mostrando que apenas o duplo ciclo obteve valores terapêuticos.⁹⁸

No processamento com dois ciclos, o primeiro é denominado ciclo pesado e é feito a 160 G, por 20 minutos. O segundo, chamado de leve, é feito a 400 G, por 15 minutos.^{4,93-95,98-}

¹⁰¹ Ao final do ciclo pesado, observam-se três frações: superior, de cor amarelo âmbar, que

representa o plasma, e uma vermelha, inferior, representando a série vermelha. Entre essas duas colunas, existe uma estreita faixa esbranquiçada chamada de zona intermediária, também denominada de zona de névoa (*buffycoat*), a qual representa o local de maior concentração das plaquetas (5% do volume do tubo). Todo o plasma e os 2 mm superiores da porção vermelha são coletados para realizar a segunda centrifugação. Incluem-se os 2 mm da porção inferior porque as plaquetas mais jovens, que são aquelas com maior atividade, são também as maiores e podem se misturar com as hemácias na interface. No intuito de incluir todas as plaquetas, faz-se necessário colher a porção superior da série vermelha.⁸⁸ (Figura 4)

Figura 4 – Preparo do plasma rico em plaquetas (PRP)



Legenda: A – Aspecto do sangue após a primeira centrifugação. Porção superior: plasma; porção inferior: células vermelhas; e porção intermediária: plaquetas. B – Marcação 2 mm abaixo da linha superior da série vermelha. C – Esquema após a segunda centrifugação. Porção superior: plasma pobre em plaquetas (PPP); e porção inferior: PRP. D – a seta aponta a representação de 10% do volume inicial do sangue.

Fonte: Modificado de MESSORA *et al.*, 2011

Após seu preparo, o PRP ainda precisa ser ativado para liberar os FCs. Isso pode ser realizado pela adição de cloreto de cálcio 10%⁹³ ou cloreto de cálcio 10% associado a trombina.⁸⁸ Os valores absolutos dos FCs obtidos variam com o método de ativação.^{91,102} Estudos comparativos mostram que a ativação do cloreto de cálcio é superior e evita possíveis

complicações da trombina, tais como resposta imune ou inibição de proliferação celular.^{101,103} Trabalhos iniciais com trombina bovina relatavam casos de sangramento secundário, causados por anticorpos contra fator Va bovino, realizando reação cruzada com fator Va humano.^{85,93} Como hoje o preparo da trombina bovina é mais refinado, os níveis dos anticorpos caíram de 50 mg/mL para menos de 0,2 mg/mL, não existindo mais esse risco.¹⁴

PRP é estável por até oito horas após o seu preparo e, após a ativação, mais de 95% dos FCs pré-sintetizados são secretados na primeira hora e continuarão a ser secretados pela vida útil da plaqueta (sete dias).¹⁴

PRP amplifica o processo de cicatrização *in vivo* e já foi utilizado em procedimentos cirúrgicos bucomaxilofaciais, ortopédicos, plásticos e em lesões de tecido mole, com resultados promissores.^{88,104-107} Existem mais de 1.000 artigos relacionando PRP com cicatrização desde 1954 até a presente data, porém com resultados muito variados. Isso se deve à falta da uniformidade nos desenhos dos estudos,^{108,109} o que tem levado pesquisadores a criarem experimentos mais controlados, no intuito de validar e promover o uso de PRP.^{14,15}

A grande maioria dos estudos com PRP referem-se à regeneração óssea e utilizam a microscopia convencional para analisar os parâmetros desejados.^{101,110,111} Mesmo nos estudos realizados em tecidos moles, o uso de imuno-histoquímica é limitado, tornando o presente estudo diferenciado.^{84,112,113}

2. JUSTIFICATIVA

A cicatrização normal de pacientes queimados pode apresentar sequelas importantes, em especial quando a lesão ocorre no grupo pediátrico, sobre articulações (alteração de mobilidade) ou na face (alterações psicológicas). O PRP se mostra um fator coadjuvante para acelerar a cicatrização e apresenta grande potencial em queimaduras, que são feridas com altos índices de cicatrizes patológicas.

O uso de fatores de crescimento recombinantes em queimadura de segundo grau mostra redução no tempo de cicatrização e no tamanho da ferida, quando apenas um FC (FGF, EGF ou fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)) é utilizado.¹¹⁴ Observando-se benefícios de fatores únicos, seria importante avaliar o PRP para esse tipo de tratamento, pois ele contém múltiplos fatores de crescimento e, quando juntos, FCs apresentam efeito sinérgico.

Apesar da hipotética melhora na cicatrização que o PRP poderia oferecer para queimados, existe uma óbvia limitação, pois apenas 10% do sangue coletado é convertido em PRP. Logo, não seria possível a aplicação de PRP em grandes áreas. Porém, vislumbra-se a aplicação do PRP em locais críticos, tais como face, região cervical e mãos, nos quais até pequenas melhoras na qualidade de cicatrização poderiam se constituir em extremo benefício. Nesses locais, as cicatrizes inestéticas resultantes são bastante incapacitantes.

3. OBJETIVOS

Validar um modelo experimental de queimadura em animais.

Analisar a cicatrização de queimaduras de segundo grau, segundo grau associado a diabetes *mellitus* e terceiro grau tratadas com plasma rico em plaquetas em ratos.

4. MÉTODO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e no Laboratório de Reparo Tecidual (LRT) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais em Experimentação do IBRAG, da UERJ (protocolo 056/2012). Todos os procedimentos seguiram os protocolos estabelecidos para pesquisa em animais no Brasil.¹¹⁵

A seção de método está dividida em duas partes. A primeira se refere ao modelo experimental de queimaduras de tamanho e profundidade padronizadas e, a segunda, ao uso de PRP em queimaduras.

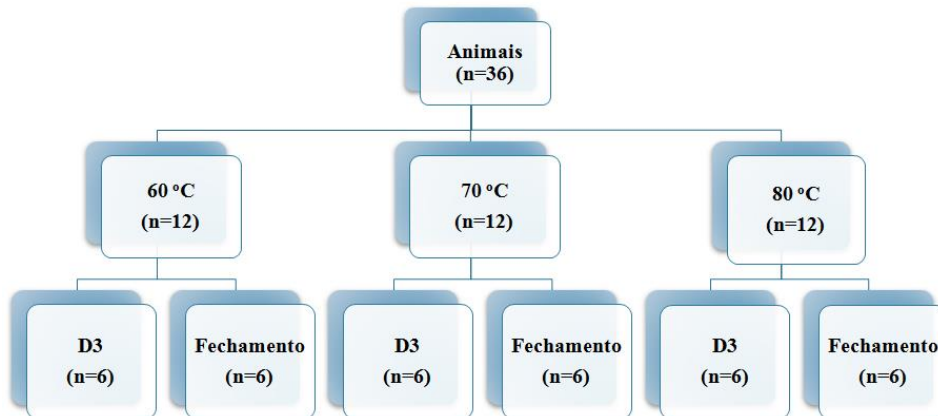
4.1. Descrição de um modelo experimental para a criação de queimaduras de tamanho e profundidade padronizadas

4.1.1. Animais

Foram utilizados 36 ratos machos *Wistar (Rattus norvegicus)*, com peso variando entre 275 e 300 g, alocados aleatoriamente em três grupos (70 °C, 80 °C e 90 °C), com 12 animais cada. Os animais desses grupos foram distribuídos em dois subgrupos: D3 – que foram mortos no terceiro dia para análise histológica; e fechamento – que foram acompanhados até o fechamento das feridas originadas pelas queimaduras. (Figura 5)

Os animais ficaram acomodados em gaiolas individuais e apropriadas, sob controle rigoroso de temperatura e umidade, com ciclos de luz/escuro de 12 horas, e tinham acesso livre à água e ração.

Figura 5 – Esquema da distribuição de grupos para a criação de queimaduras de tamanhos e profundidades padronizados



4.1.2. Equipamento experimental de queimadura

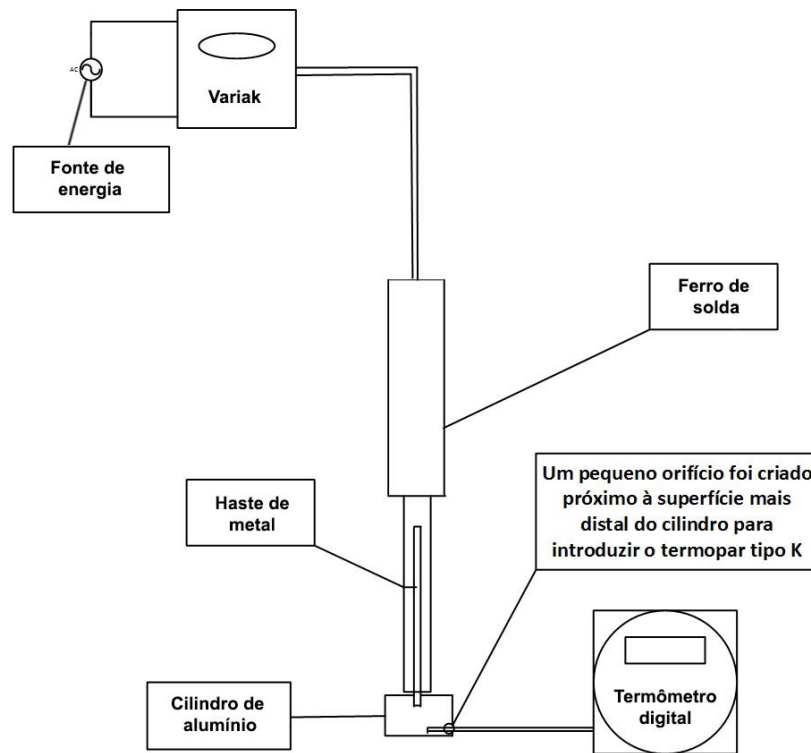
Para a criação de um equipamento que produzisse queimaduras de tamanho e profundidade padronizados, a cabeça de um ferro de solda industrial (Weller 80 *watts* – *Cooper Hand Tools*; Sorocaba, SP, Brasil) foi removida e substituída por um cilindro de alumínio de 23 mm de diâmetro. Apesar de optar pelo cilindro de 23 mm, também estavam disponíveis cilindros com 19 e 32 mm, sendo ainda possível preparar cilindros com outros diâmetros.

Um pequeno orifício foi criado próximo à superfície mais distal do cilindro, onde um termopar tipo K (Minipa; São Paulo, SP, Brasil) foi inserido e acoplado a um termômetro digital (Minipa MT-401A; São Paulo, SP, Brasil) para aferir a temperatura da superfície de contato.

Para se obter controle da temperatura, utilizou-se o seguinte princípio: o ferro de solda é uma resistência, o que significa que este se opõe à passagem de eletricidade gerando, calor. Se é inserido um autotransformador variável (JNG TDGC2 0,5 KVA, Liushi, Zhejiang, China), também conhecido como Variac, entre o ferro de solda e a fonte de eletricidade, pode-se controlar a saída de energia para o ferro de solda, resultando em controle preciso da temperatura. Como o Variac possui mostrador analógico, utilizou-se um voltímetro digital

(Minipa ET-1002; São Paulo, SP, Brasil) para determinar a voltagem exata fornecida ao ferro de solda. Durante a fase piloto do trabalho, determinou-se que, para obter as temperaturas de 60 °C, 70 °C e 80 °C seria necessário regular o Variac para 55 V, 60 V e 65 V, respectivamente, e o tempo necessário para estabilizar a temperatura era de 20 minutos. O equipamento possui um sistema de peso chumbado de 1 kg, utilizado para manter a pressão constante sobre a pele. (Figura 6 e 7)

Figura 6 – Desenho esquemático do equipamento desenvolvido para a produção de queimaduras nos ratos

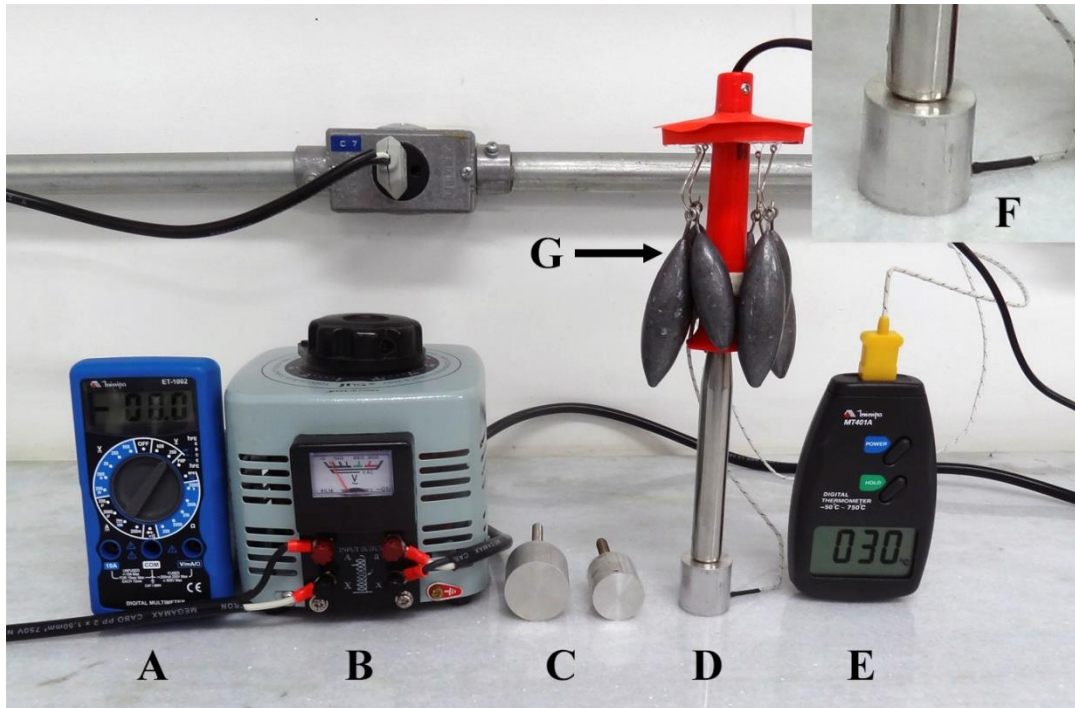


4.1.3. Técnica de queimadura

Utiliza-se a fórmula de Meeh's ($A=10 \times W^{2/3}$, onde: A = área em cm^2 , 10 é uma constante e W = peso do animal em gramas) para calcular a superfície de área corporal e determinar que a queimadura, com cilindro de 23 mm, representa aproximadamente 1% da superfície corporal total.⁶⁸

Dois dias antes da confecção da queimadura, o dorso do animal foi tricotomizado com barbeador elétrico e creme depilatório comercial (Veet™ - Rickitt Bernckiser Colômbia AS; Calle, Cali, Colômbia).

Figura 7 – Fotografia do equipamento



Legenda: A – voltímetro digital; B – Variac; C – cilindros de alumínio de diferentes diâmetros; D – ferro de solda industrial; E – termômetro digital; F – entrada do termopar no cilindro de alumínio; G – sistema de pesos para criar pressão de contato.

Após seis horas de jejum, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de 80 mg/kg de quetamina (Agener União; Embu-Guaçu, SP, Brasil) e 12 mg/kg de xilazina (Agener União; Embu-Guaçu, SP, Brasil).

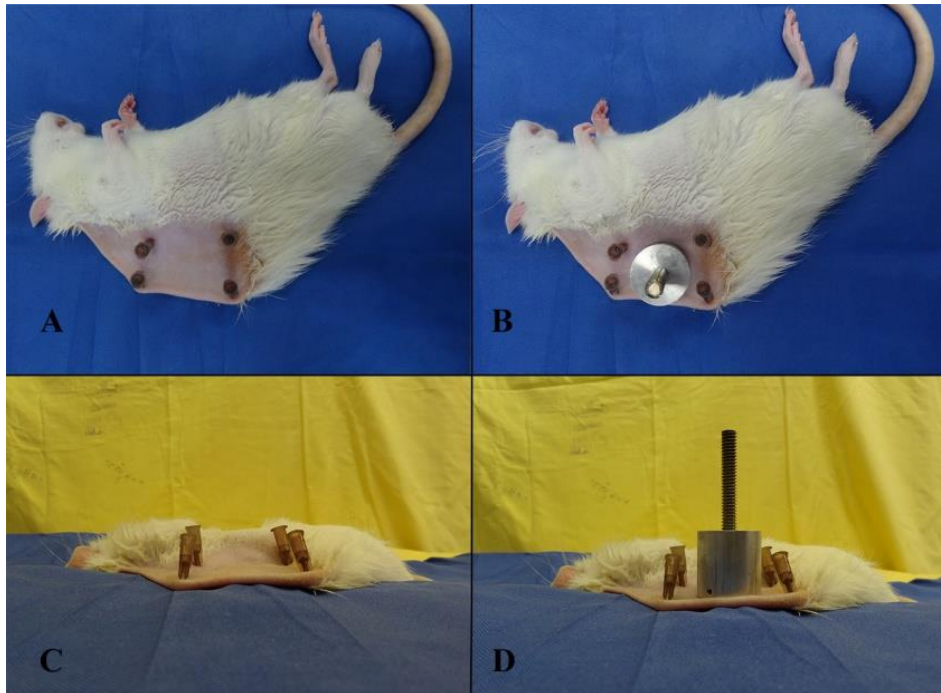
Depois de anestesiados, os animais foram colocados em decúbito lateral, com uma placa de isopor de 2 cm de altura adjacente. A pele do animal foi esticada e fixada com quatro agulhas hipodérmicas (1,25 cm x 26 G) (Solidor, Barueri, SP, Brasil), não somente para poder acomodar, mas também para permitir contato completo e perpendicular do aparato de queimar. (Figura 8)

Ao atingir a temperatura desejada, aguardou-se cinco segundos para estabilizar a temperatura antes de aplicar sobre a pele por dez segundos. (Figura 9) Foram necessários três minutos entre uma queimadura e outra para o cilindro retornar à temperatura desejada.

Após realizar a lesão, as queimaduras eram deixadas sem nenhum tipo de curativo e os animais retornavam para gaiolas individuais. Após três dias, metade dos animais era morta

(seis animais por grupo) e a área da queimadura era removida junto com um segmento de pele sadia para a determinação da profundidade da lesão. A outra metade era acompanhada até o completo fechamento da lesão.

Figura 8 – Posição dos animais submetidos a queimaduras



Legenda: A pele é posicionada e fixada sobre isopor: A – Visão superior; B – Visão superior, mostrando a acomodação completa do cilindro de alumínio; C – Visão lateral; D – Visão lateral, mostrando a acomodação completa do cilindro de alumínio.

4.1.4. Análise macroscópica

A análise macroscópica da cicatrização foi realizada utilizando-se uma folha plástica transparente, onde a ferida foi tracejada no dia da queimadura e, a cada sete dias, até a completa cicatrização. Após a digitalização dos desenhos, a área das feridas eram determinadas pela utilização do *software* ImageJ 1.47v (National Institutes of Health, Bethesda, MA, Estados Unidos). As feridas foram fotografadas nessas mesmas datas e, em nenhum momento, houve tentativa de remoção das escaras. Os dados foram expressos em porcentagem da área inicial.

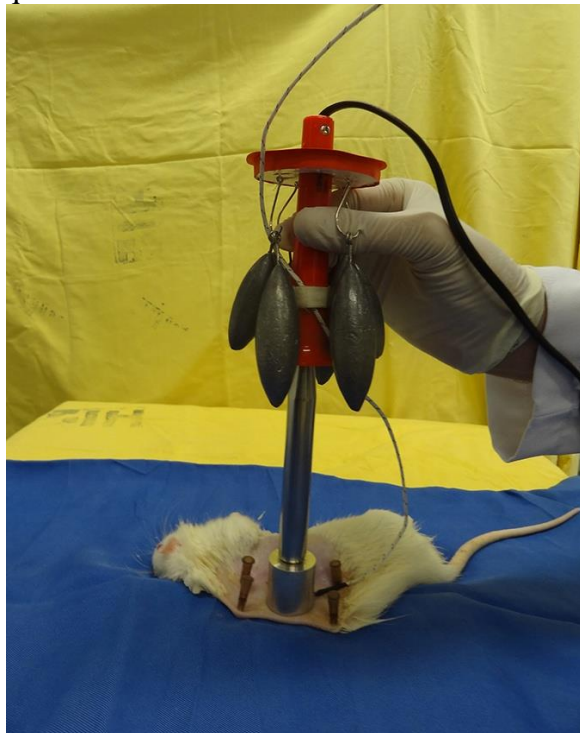
4.1.5. Análise microscópica

As lesões foram coletadas e fixadas em formaldeído tamponado a 10%. O tecido foi processado em concentrações crescentes de álcool e xilol e incluído em parafina. Cortes de 5 μm foram realizados e os preparados histológicos foram coradas com hematoxilina e eosina.

A profundidade da queimadura e a espessura total da derme foram medidas em cinco locais na ferida, utilizando-se a sua extensão total, da direita para a esquerda, nos pontos 1/4, 3/8, 1/2, 5/8 e 3/4 da lesão, com a utilização do *Pannoramic Viewer* (3Dhistech Kft; Budapeste, BP Hungria), após os preparados histológicos serem digitalizados, utilizando-se *Pannorami MIDI digital slide scanner* (3Dhistech Kft; Budapeste, BP, Hungria).

Os critérios para a determinação da profundidade da queimadura foram necrose celular, oclusão vascular e dano ao colágeno. Os dados foram apresentados em duas formas: mensuração em μm e percentual da derme envolvida. Para calcular este percentual, a profundidade da queimadura foi multiplicada por 100 e dividida pela espessura total da derme.

Figura 9 – Momento da queimadura



Legenda: Contato perpendicular do equipamento em relação à pele e pesos utilizados para manter a pressão constante.

4.1.6. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A diferença estatística entre os grupos foi avaliada utilizando-se Mann-Whitney. Uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. Todas as análises foram realizadas com a utilização do *software* GraphPad Prisma V5.0 (GraphPad Software Inc; La Jolla, CA, Estados Unidos).

4.2. Utilização de plasma rico em plaqueta em queimaduras

4.2.1. Animais

Noventa ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com peso variando entre 275 e 300 g, foram distribuídos, de forma randômica, em três grupos, cada um contendo 30 animais: queimaduras de segundo grau (SG), segundo grau associado a diabetes *mellitus* (SGD) e terceiro grau (TG). Em todos os grupos, os animais foram aleatoriamente distribuídos em três subgrupos, cada um contendo dez animais: controle, tratados com PRP e animais utilizados para o preparo do PRP (doadores). (Figura 10)

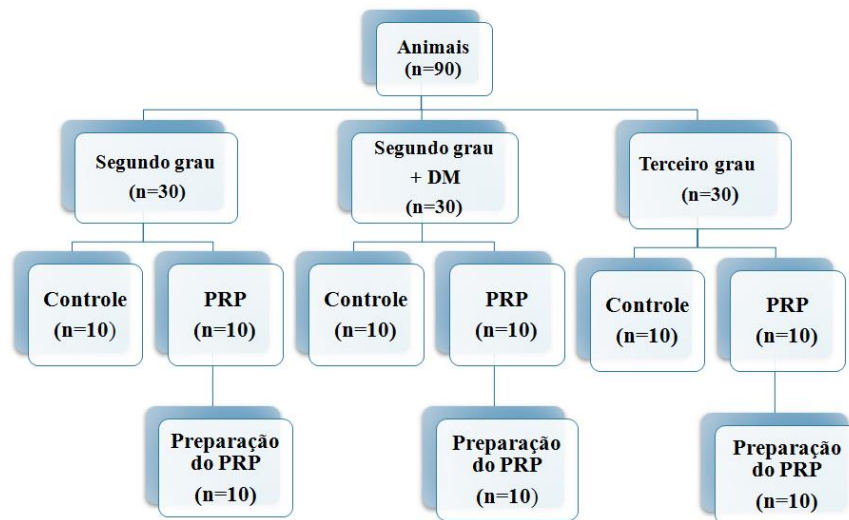
Os animais ficaram acomodados em gaiolas individuais e apropriadas, sob controle rigoroso de temperatura e umidade, com ciclos de luz/escuro de 12 horas. Os animais tinham acesso livre à água e ração.

4.2.2. Preparação do PRP

O preparo do PRP seguiu o protocolo estabelecido por Messoria,⁹³ utilizando-se uma centrífuga de bancada. Para essa preparação, os ratos doadores foram anestesiados por meio de injeção intramuscular de 80 mg/kg de quetamina (Agener União; Embu-Guaçu, SP, Brasil) e 12 mg/kg de xilazina (Agener União; Embu-Guaçu, SP, Brasil). Em seguida, foram

submetidos a punção cardíaca para a coleta de 6,5 ml de sangue em uma seringa contendo 0,7 ml de citrato de sódio, após o que foram mortos por sobre dose anestésica. O sangue foi acondicionado em um tubo plástico siliconizado de coleta de sangue a vácuo (Biological Liquids, Vacuette; Campinas, SP, Brasil) e, em seguida, submetido a centrifugação a 160 G, por 20 minutos.

Figura 10 - Esquema da distribuição de grupos e subgrupos de ratos para a utilização de plasma rico em plaquetas em queimaduras.



Ao final da centrifugação, marcou-se um ponto 2 mm abaixo da linha que separa o plasma da série vermelha, e todo o conteúdo acima desta linha foi transferido para outro tubo a vácuo. Neste segundo tubo, foi previamente marcada uma linha correspondente a 0,72 ml, que significa 10% do volume total que engloba o sangue coletado e citrato de sódio. A amostra foi, então, submetida a nova centrifugação a 400 G, por 15 minutos, resultando em dois componentes: um acima da linha demarcada, denominado PPP, e um abaixo, denominado PRP. O PPP foi descartado, restando apenas o PRP, que foi ativado no momento apropriado, com 0,05 ml de cloreto de cálcio 10% para cada 1 ml de PRP.

4.2.3. Contagem plaquetária

Para confirmar o aumento da concentração, tanto o sangue total como o PRP foram submetidos à contagem de plaquetas. A contagem foi realizada por analisador hematológico automatizado (Cell-Dyn Ruby; Abbott Diagnostics, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

4.2.4. Indução do diabetes *mellitus*

Os animais do grupo SGD, após 12 horas de jejum e sete dias antes da realização da queimadura, receberam dose única de estreptozotocina (45 mg/kg de peso corporal em solução tampa citrato, pH 4,5) (Sigma, Inc; St. Louis, MO, Estados Unidos) e solução de 6% de sacarose na água, para aceleração do desenvolvimento do DM.¹¹⁶ No dia de realizar a queimadura, a glicemia foi dosada por punção venosa caudal, utilizando-se o *Accu-Check Advantage II* (Roche Diagnóstico, São Paulo, SP, Brasil). DM foi definido como glicemia maior que 300 mg/dL.

4.2.5. Queimadura

Dois dias antes da confecção da queimadura, o dorso do animal foi tricotomizado com barbeador elétrico e creme depilatório comercial (Veet™ - Rickitt Bernckiser Colômbia AS; Calle, Cali, Colômbia).

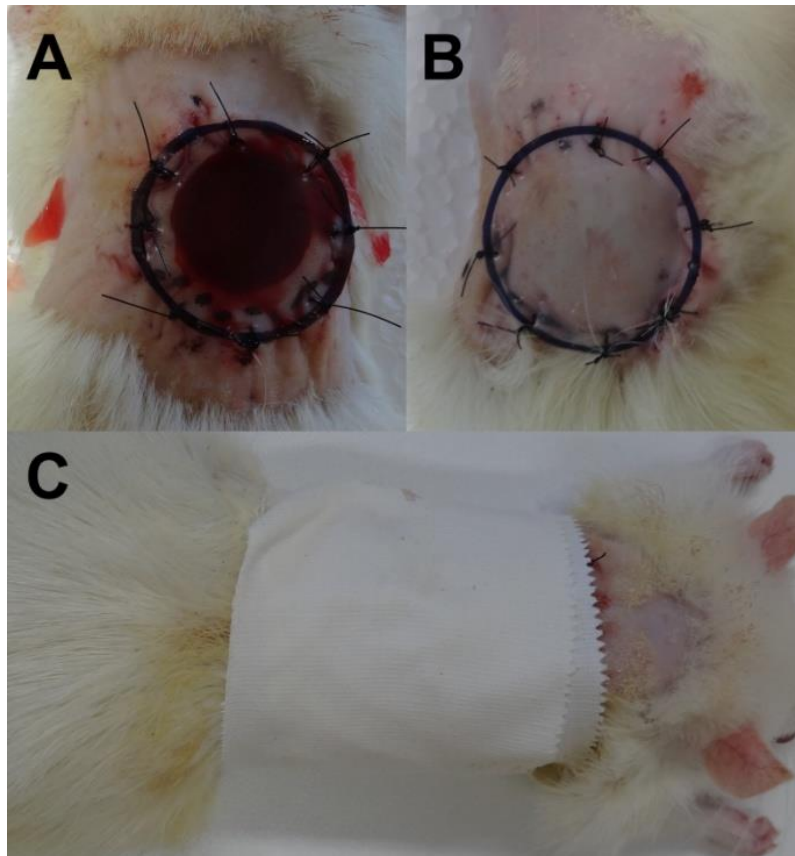
Após seis horas de jejum, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de 80 mg/kg de quetamina (Agener União; Embu-Guaçu, SP, Brasil) e 12 mg/kg de xilazina (Agener União; Embu-Guaçu, SP, Brasil).

Depois de anestesiados, os animais foram fixados conforme descrição anterior. Quando o equipamento atingiu a temperatura desejada (70 °C graus para as queimaduras de SG e SGD e 80 °C para as de TG), aguardamos cinco segundos para estabilizar a temperatura, antes de aplicar sobre a pele por dez segundos. Após realizar uma queimadura, foram necessários três minutos para o cilindro retomar a temperatura desejada.

Após a realização da queimadura, prosseguiu-se com a ativação do PRP, aguardando-se dez minutos até se obter a forma de gel, antes de posicioná-lo sobre a queimadura. Para manter o PRP em posição, uma cobertura plástica redonda de 27 mm de diâmetro (disco plástico semirrígido) foi suturada sobre a queimadura; como o disco apresenta um diâmetro

maior do que a área da queimadura, nenhuma sutura foi realizada na lesão. Para evitar a remoção do curativo pelos dos animais, foi utilizada fita adesiva, envolvendo todo o tórax, sendo o mesmo procedimento realizado nos subgrupos controle, com exceção daquele em houve aplicação do PRP. (Figura 11). O curativo foi removido no quinto dia, no intuito de se realizar o tracejamento da ferida e, após isso, nenhum curativo foi aplicado nos animais.

Figura 11 – Curativo após a produção de queimadura



Legenda: A – Disco plástico, mantendo o plasma rico em plaquetas em posição; B – Mesmo disco plástico, utilizado no controle; C – Curativo com fita adesiva para evitar remoção dos discos pelo animal.

4.2.6. Análise macroscópica

O peso dos animais foi verificado no dia da queimadura e após cinco (D5), quatorze (D14) e vinte um dias (D21). Para avaliar a reepitelização nos mesmos dias acima mencionados, utilizamos uma folha transparente plástica, onde os contornos das feridas foram desenhados e, em seguida, essas mesmas feridas foram fotografadas. Após digitalização, a área das feridas foi determinada pelo programa ImageJ (National Institutes of Health,

Bethesda, MA, Estados Unidos). Em nenhum momento houve tentativa de remover a casca da ferida. Os dados foram expressos em porcentagem em relação à área da ferida inicial.

4.2.7. Coleta de material e análise microscópica

Os animais foram mortos no 21.º dia após a queimadura, por sobredose anestésica. Um fragmento de pele incluindo a lesão e tecido normal foi fixado com formaldeído tamponado a 10% (pH 7,2). O tecido foi processado com concentrações crescentes de álcool e xilol e incluído em parafina. Após cortes de 5 µm, os preparados histológicos foram montados e corados com hematoxilina e eosina. Outro fragmento da lesão foi congelado a -70 °C. Os preparados histológicos foram digitalizados, utilizando-se *Pannorami MIDI digital slide scanner* (3Dhistech Kft; Budapeste, BP, Hungria). A espessura da neoepiderme e o tecido da granulação foram mensurados em três pontos diferentes na ferida (respectivamente da direita para a esquerda, nos pontos 1/4, 1/2 e 3/4, com a utilização do *Pannoramic Viewer* (3DhistechKft; Budapeste, BP, Hungria). Os dados foram expressos pela média em µm.

4.2.8. Imuno-histoquímica e quantificações

Para quantificação dos macrófagos CD 68 positivos (CD68+), cortes foram incubados para anti-CD-68 de camundongo (1:300) (Serotec Inc.; Raleigh, NC, Estados Unidos). Para a recuperação antigênica, os cortes foram digeridos com 0,1% tripsina (Difco Laboratories; Detroit, MI, Estados Unidos). Em seguida, os cortes foram incubados em 3% de H₂O₂ com metanol para inibir peroxidação endógena. Após lavagem, todos os anticorpos primários foram detectados, usando-se EnVision System (Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos), sendo a diaminobenzina utilizada como cromógeno. Os *slides* foram contra corados com hematoxilina. Nenhuma marcação foi observada nos cortes onde o anticorpo primário foi omitido. Seis campos randômicos por animal (33.400 µm²) foram analisados no tecido de granulação, utilizando-se *Pannoramic Viewer* (3DhistechKft; Budapeste, BP, Hungria), após os preparados histológicos serem digitalizados no *Pannorami MIDI digital slide scanner* (3Dhistech Kft; Budapeste, BP, Hungria). Os dados foram apresentados como a média de macrófagos positivos para CD 68 / 33.400 µm².

Para a quantificação de vasos sanguíneos CD31+, macrófagos CD163+, neutrófilos mieloperoxidase positivos (MPO+), células MMP2+ e TGF- β +, a análise imuno-histoquímica foi realizada com a utilização do *Discovery XT automated IHC stainer* (Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, Estados Unidos), empregando-se o *kit* de detecção *Ventana Omnimap detection kit* (Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, Estados Unidos), com os seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal de camundongo anti CD31 (Abcam; Cambridge, Reino Unido), anticorpo monoclonal de coelho anti-CD163 (Abcam; Cambridge, Reino Unido), anticorpo policlonal de coelho anti-mieloperoxidase (Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos), anticorpo policlonal anti-MMP2 (Booster; Fremont, CA) e anticorpo policlonal de coelho anti-TGF β 1 (Bioss; Woburn, MA, Estados Unidos). Para anticorpos secundários, ou foi utilizado anti-coelho HRP, ou anti-rato ou anti-camundongo. A amplificação do sinal foi realizada pela utilização do *Ventana Omnimap detection kit* (Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, Estados Unidos). Seis campos aleatórios da região superficial do tecido de granulação por animal foram analisados (6.900 μm^2 por CD163; 33.400 μm^2 por CD31, MPO, e TGF- β ; e 98.300 μm^2 por MMP2). Os dados foram expressos em vasos ou células positivas pela área teste em μm^2 .

4.2.9. Análise bioquímica

O depósito de colágeno foi quantificado pelo ensaio da hidroxiprolina das lesões congeladas, como previamente descrito.¹¹⁷ Em resumo, o tecido seco é desengordurado (1,5-7,0 mg) e hidrolisado em HCl 6M por 18 horas, a 118 °C. O material hidrolisado foi diluído com água destilada, neutralizado com NaOH 6M e centrifugado a 3.000 rpm, por 15 minutos. Alíquotas diluídas do material hidrolisado (80 μl) foram misturadas com 40 μl de cloramina T (0,05M) (Merck &Co. Inc.; White house Station, NJ, Estados Unidos) e incubadas por 20 minutos a 25 °C. Em seguida, 40 μl de ácido perclórico (3,17 M) (Vetec; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 40 μl de 4-dimetilamino benzaldeído (Merck &Co. Inc.; WhitehouseStation, NJ, Estados Unidos) foram adicionados. Após isso, as placas foram incubadas por 20 minutos, a 60 °C. A coloração exibida foi analisada espectrofotometricamente a 550 nm. A concentração de hidroxiprolina foi gerada a partir de uma curva padrão de diferentes concentrações de L-4-hidroxiprolina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, Estados Unidos). Os dados foram expressos em ng de hidroxiprolina por mg de tecido.

4.2.10. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A diferença estatística entre os grupos foram avaliadas utilizando-se os testes de Mann-whitney ou One-Way Anova. Uma diferença no $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. Todas as análises foram realizadas com o uso do *software* GraphPad Prisma V5.0 (GraphPad Software Inc; La Jolla, CA, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

Nenhuma complicação clínica foi observada durante o experimento ou na validação do modelo experimental.camada muscular da derme – *Panniculus carnosus*)

5.1. Modelo para a criação de queimaduras de tamanho e profundidade padronizadas

5.1.1. Avaliação macroscópica

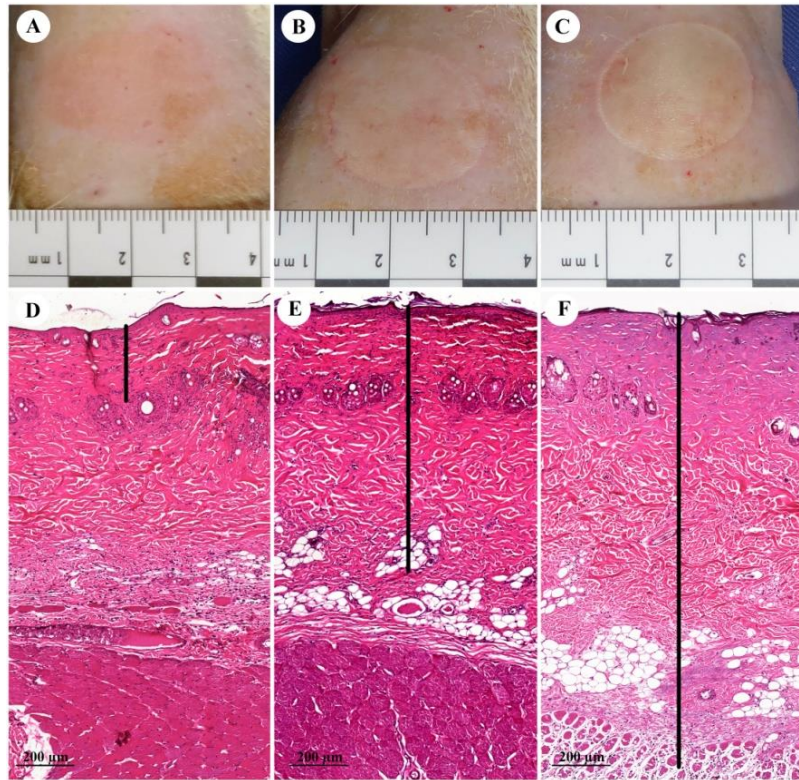
Não foram observadas mortes entre os animais, e todas as queimaduras foram homogêneas, com as bordas bem visíveis, desde o momento de sua criação (Figura 12), permanecendo assim até o terceiro dia.

Observou-se diferença entre o tempo necessário para a cicatrização e a temperatura utilizada para criar a lesão. Para as temperaturas de 60 °C, 70 °C e 80 °C foram necessários 21, 35 e 49 dias para cicatrização completa, respectivamente. (Gráfico 1)

5.1.2. Avaliação microscópica

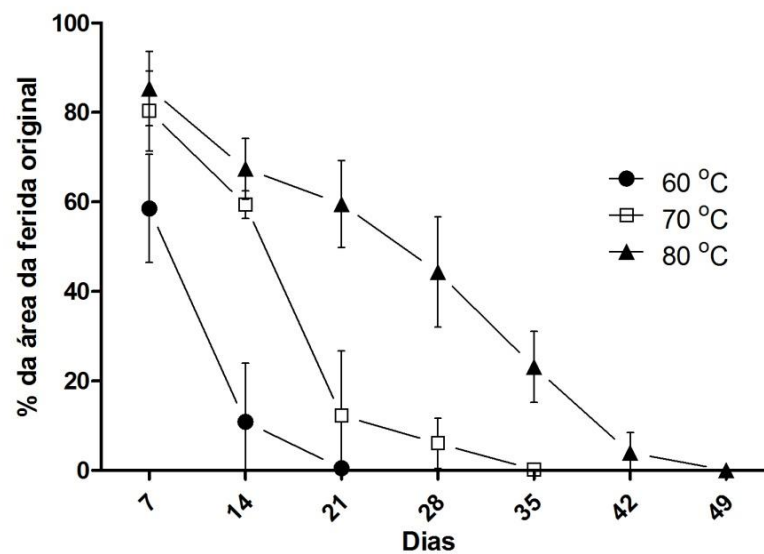
A análise histológica das queimaduras apresentou presença de necrose epidérmica, infiltração perivascular difusa e degeneração do colágeno, enquanto a pele normal possuía aspecto microscópico característico. Os animais expostos a 60 °C desenvolveram queimadura de segundo grau superficial (dano limitado a 1/3 superior da derme). Os animais expostos a 70 °C apresentaram queimadura de segundo grau profundo (dano envolvendo os 2/3 inferiores da derme) e os animais expostos a 80 °C revelaram queimadura de terceiro grau (envolvimento de toda derme e a camada muscular da derme – *Panniculus carnosus*). (Figura 12)

Figura 12 – Análise das queimaduras



Legenda: Porção superior – Aspecto macroscópico das queimaduras: A – queimadura de 60 °C; B – queimadura de 70 °C; C – queimadura de 80 °C. Porção inferior – Aspecto microscópico das queimaduras: D – queimadura de 60 °C (queimadura de segundo grau superficial), barra central mostrando lesão acometendo a porção superior da derme; E – queimadura de 70 °C (queimadura de segundo grau profundo), barra central mostrando lesão acometendo quase toda a derme; E – queimadura de 80 °C (queimadura de terceiro grau), barra central mostrando lesão acometendo toda a derme e camada muscular da derme.

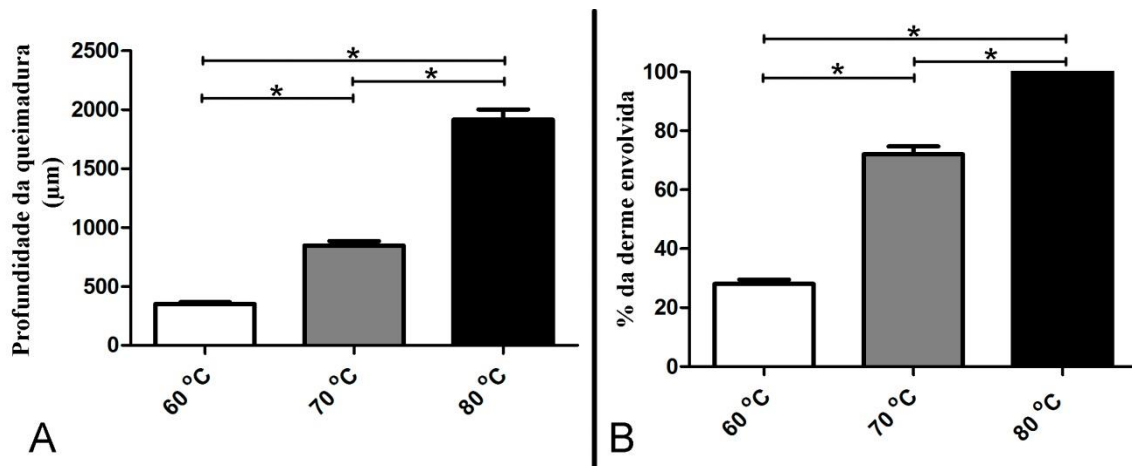
Gráfico 1 – Porcentagem da ferida original



Legenda: Para queimaduras de 60 °C, a completa reepitelização ocorreu em 21 dias; para queimaduras de 70 °C, em 35 dias; e para queimaduras de 80 °C, em 49 dias. Dados apresentados em média \pm desvio padrão.

A profundidade média da queimadura foi $350,2 \pm 48,32 \mu\text{m}$ para 60°C , $847,2 \pm 116,0 \mu\text{m}$ para 70°C e $1915 \pm 270,3 \mu\text{m}$ para 80°C ($p < 0,05$). Isso representou um envolvimento de 28%, 72%, e 100% da derme para 60°C , 70°C e 80°C , respectivamente. Houve diferença estatística entre todos os grupos em relação à profundidade da lesão. (Gráfico 2)

Gráfico 2 – Avaliação da profundidade da queimadura



Legenda: A – profundidade total em μm ; B – Porcentagem de derme envolvida. Dados apresentados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

5.2. Uso de plasma rico em plaquetas em queimaduras

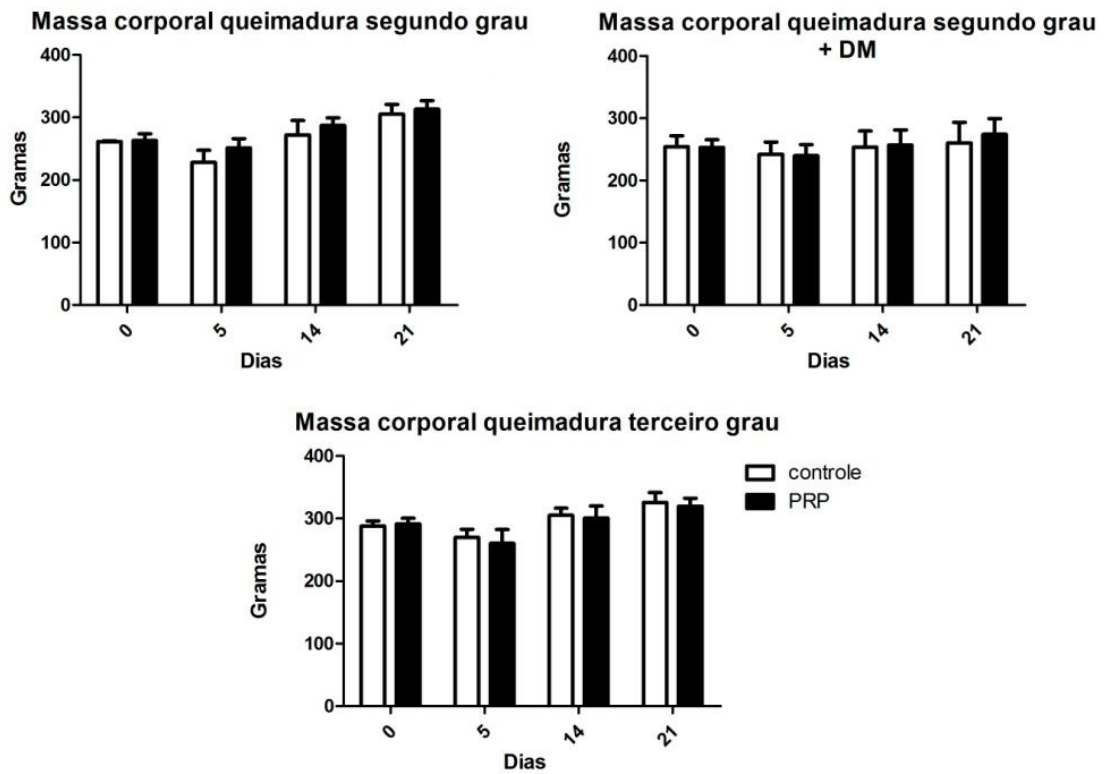
5.2.1. Peso e glicemia

Não houve diferença entre o peso dos animais nos grupos controle e tratados durante o experimento (Gráfico 3). A glicemia foi consistentemente superior a 300 mg/dL no dia 0 (queimadura e preparação do PRP) e dia 21 (morte dos animais) no grupo SGD.

5.2.2. Contagem de plaquetas

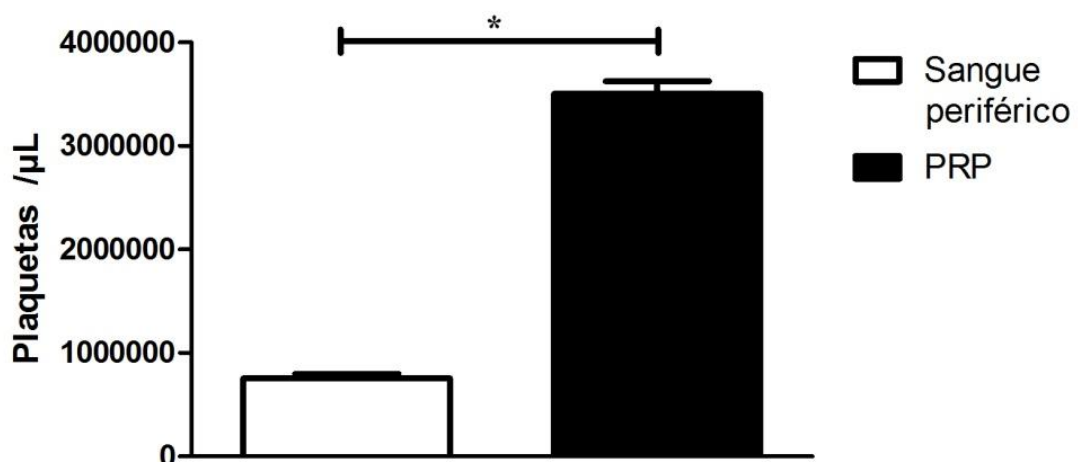
A contagem média de plaquetas do sangue periférico foi 754.667 ± 42.051 plaquetas/dL, enquanto a média do PRP foi $3.503.000 \pm 22.504$ plaquetas/dL. Observou-se aumento significativo na concentração com uma média de 465% ($p < 0,005$) (Gráfico 4).

Gráfico 3 – Avaliação da massa corporal dos grupos de ratos



Legenda: Não houve diferença entre grupos controle e tratados com plasma rico em plaquetas. Dados apresentados em média \pm desvio padrão.

Gráfico 4 – Contagem de plaquetas.

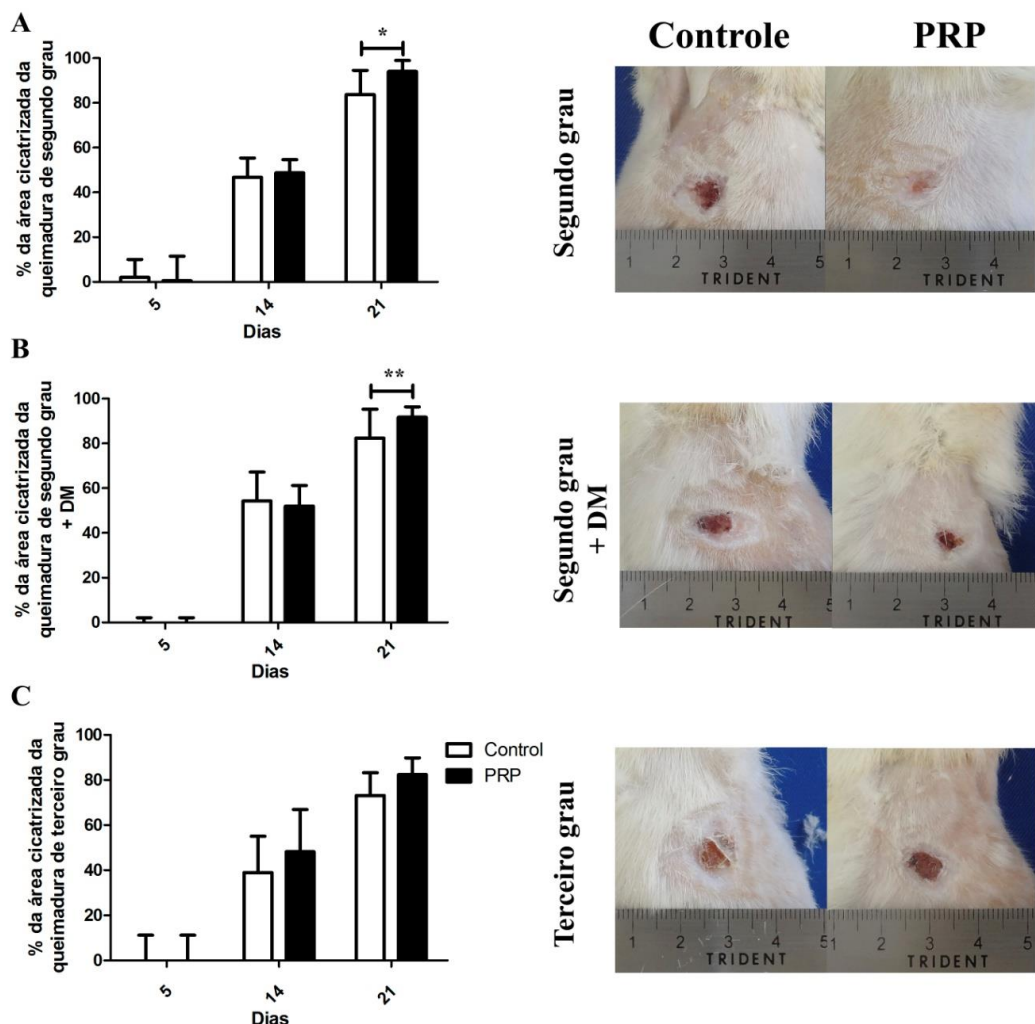


Legenda: Existe diferença entre a contagem de plaquetas do sangue periférico e do plasma rico em plaquetas. Dados apresentados em média \pm desvio padrão. *p<0,05.

5.2.3. Análise macroscópica

No grupo SG, em D21, o percentual da área fechada foi significativamente menor no subgrupo controle que no tratado (respectivamente $83,73 \pm 10,81\%$ e $94,03\% \pm 4,92$, $p < 0,005$). O mesmo foi observado no grupo SGD, onde a área fechada do subgrupo controle foi $82,38 \pm 12,91\%$ e do PRP foi $91,68 \pm 4,68\%$ com $p < 0,05$. (Figura 13)

Figura 13 – Avaliação macroscópica da ferida



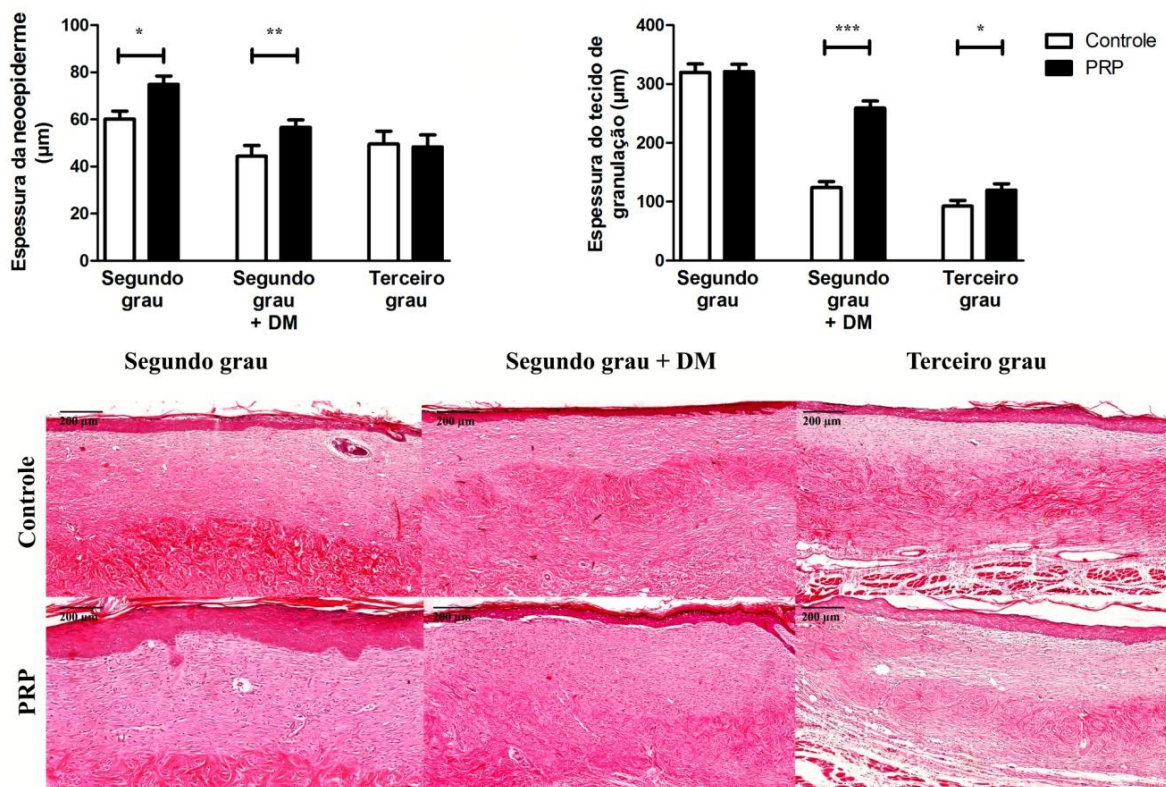
Legenda: Painel esquerdo: porcentagem das áreas cicatrizadas da ferida original. A e B – Aumento significativo na porcentagem das áreas cicatrizadas das feridas nos grupos SG e SGD, respectivamente, em D21; C – Não foi observado diferenças nas áreas cicatrizadas no grupo TG. Dados apresentados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,005$; ** $p < 0,05$. (SG – queimadura de segundo grau; SGD – queimadura de segundo grau em ratos diabéticos; TG – queimadura de terceiro grau; D21 – 21.º dia do experimento). Painel direito: aspecto macroscópico da queimadura em D21, nos diversos grupos de animais.

5.2.4. Análise microscópica

Ao se mensurar a neoepiderme, o grupo SG apresentou espessura menor no controle que no PRP. Os valores médios foram $60,22 \pm 34,07 \mu\text{m}$ e $74,91 \pm 36,21 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$). Fenômeno similar, ou seja, controle mais fino, foi observado no grupo SGD ($44,40 \pm 52,17 \mu\text{m}$ e $56,61 \pm 32,32 \mu\text{m}$ – $p < 0,0005$). (Figura 14)

No tecido de granulação, notou-se que nos grupos SGD e TG o controle foi significativamente mais fino. A média dos valores do grupo SGD foi $124,3 \pm 116,4 \mu\text{m}$ e $259,1 \pm 124,7 \mu\text{m}$ ($p < 0,0001$) e no grupo TG $92,4 \pm 113,4 \mu\text{m}$ e $119,7 \pm 110,4 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$), respectivamente, para o grupo controle e PRP. (Figura 14)

Figura 14 – Avaliação microscópica das queimaduras



Legenda: Painel superior esquerdo – aumento significativo da espessura da neoepiderme nos grupos SG e SGD tratados com PRP; Painel superior direito – aumento significativo da espessura do tecido de granulação nos grupos SGD e TG tratados com PRP. (SG – queimadura de segundo grau; SGD – queimadura de segundo grau em ratos diabéticos). Painel inferior: presença de necrose epidérmica, infiltração perivascular difusa e degeneração do colágeno. Barra: 200 µm. Hematoxilina e eosina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

5.2.5. Imuno-histoquímica

Em relação à contagem de vasos CD 31 positivos, foi observado que nos grupos SG e SGD houve um decréscimo no número de vasos no subgrupo PRP em relação ao subgrupo controle. No grupo SG, a média de vasos nesses dois subgrupos foi $7,61 \pm 1,53$ e $2,94 \pm 0,87$ vasos/campo, respectivamente ($p < 0,0001$), enquanto no grupo SGD foi $5,38 \pm 1,19$ e $3,61 \pm 0,97$ vasos/campo, nos mesmos subgrupos, respectivamente ($p < 0,0001$). (Gráfico 5 e Figura 15)

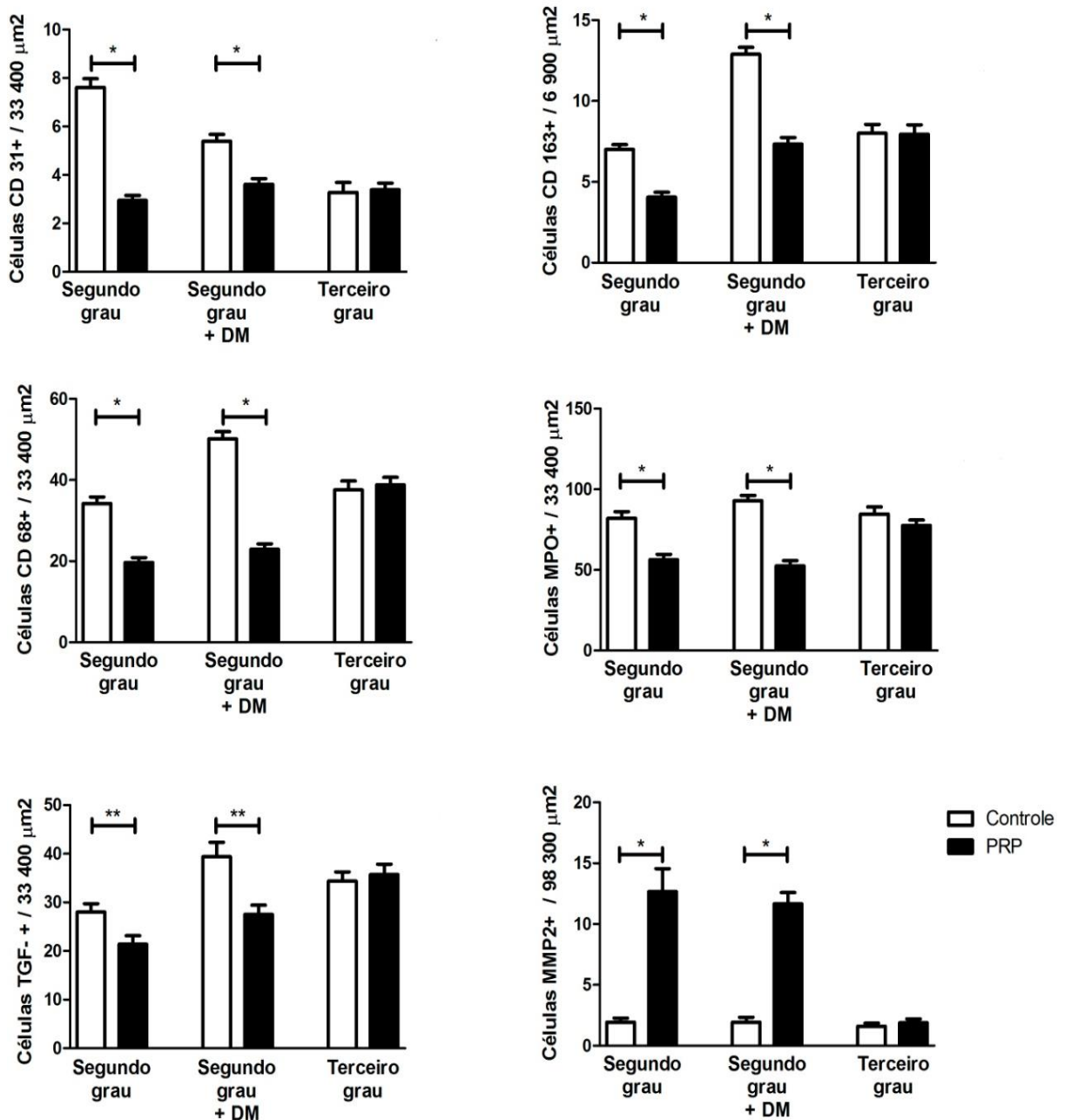
Macrófagos foram identificados por dois marcadores, CD163 e CD 68. O primeiro refere-se a macrófagos residentes e, o último, a macrófagos que infiltram a ferida. Ambos os marcadores foram reduzidos nos grupos tratados SG e SGD. Os valores médios do CD 163 para o controle e PRP no SG foram $7 \pm 1,28$ e $4,05 \pm 1,25$ células/campo, respectivamente ($p < 0,0001$) e, para o SGD, a contagem foi $12,89 \pm 1,81$ e $7,33 \pm 1,71$ células/campo, respectivamente ($p < 0,0001$). (Gráfico 5 e Figura 16) A contagem média do CD 68 para o controle e PRP do grupo SG foi $34,22 \pm 6,75$ e $19,67 \pm 5,21$ células/campo, respectivamente ($p < 0,0001$), enquanto no SGD foi $50,17 \pm 7,53$ e $22,94 \pm 5,56$ células/campo, respectivamente ($p < 0,0001$). (Gráfico 5 e Figura 17)

As células MPO positivas estavam reduzidas no grupo PRP em relação ao controle nos grupos SD e SGD. Para o grupo SG, os valores médios do controle e PRP foram $82,06 \pm 17,49$ e $56,33 \pm 14,30$ células/campo, respectivamente ($p < 0,0001$), enquanto no grupo SGD foi $92,89 \pm 14,22$ e $52,50 \pm 14,09$ células/campo, respectivamente ($p < 0,0001$). (Gráfico 5 e Figura 18)

As células TGF- β positivas estavam reduzidas no grupo PRP em relação ao controle nos grupos SG e SGD. Os valores médios do controle e do PRP para o grupo SG foram $28 \pm 7,28$ e $21,39 \pm 7,42$ células/campo, respectivamente ($p < 0,05$), enquanto no grupo SGD foram $39,39 \pm 12,63$ e $27,50 \pm 8,20$ células/campo ($p < 0,005$). (Gráfico 5 e Figura 19)

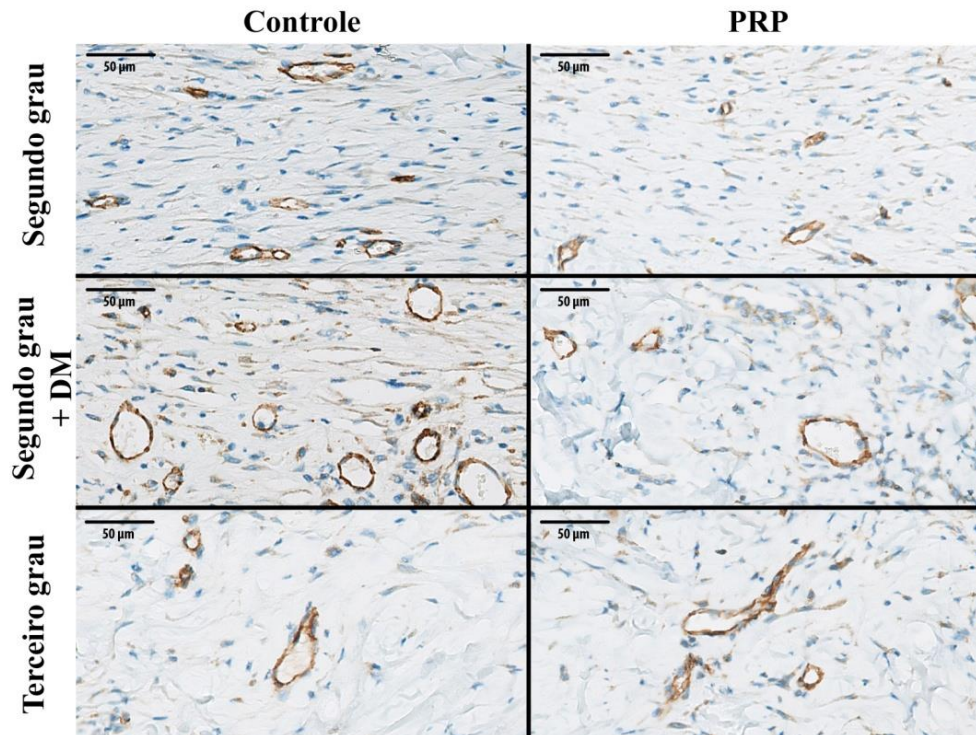
A contagem de células MMP2 positivas revelou que o grupo PRP apresentava valores superiores ao controle nos grupos SG e SGD. Os valores médios do controle e do PRP para o grupo SG foram $1,94 \pm 1,43$ e $12,67 \pm 8,02$ células/campo, respectivamente ($p < 0,001$), enquanto no grupo SGD foram $1,94 \pm 1,66$ e $11,67 \pm 3,94$ células/campo ($p < 0,001$). (Gráfico 5 e Figura 20)

Gráfico 5 – Análise imuno-histoquímica dos grupos de ratos quanto à presença de células



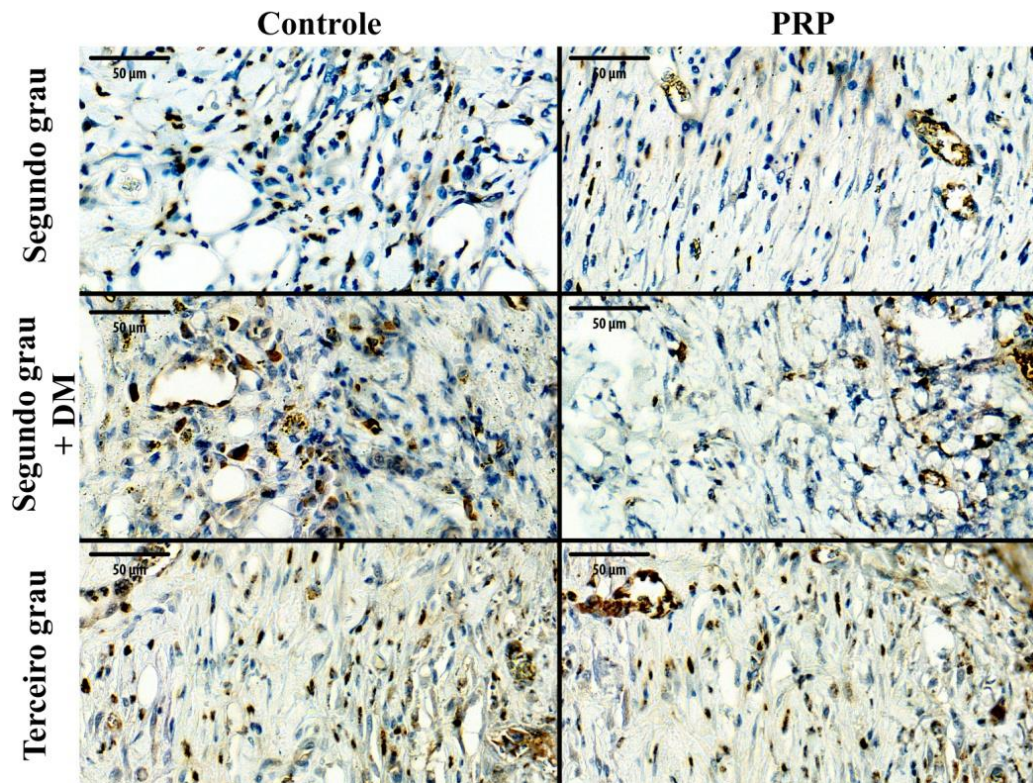
Legenda: Os grupos SG e SGD tratados com PRP apresentaram redução significativa na contagem de células CD31+ (painel superior esquerdo), CD163+ (painel superior direito), CD68+ (painel central esquerdo), MPO+ (painel central direito) e TGF-β+ (painel inferior esquerdo). Nos grupos SG e SGD tratados com PRP houve aumento significativo da contagem de células MMP-2+ (painel inferior direito). * p<0,0001; ** p<0,05 (SG – queimadura de segundo grau; SGD – queimadura de segundo grau em ratos diabéticos; MPO – mieloperoxidase; TGF-β – fator de crescimento transformanteβ; MMP-2 – metaloproteinases da matriz; PRP – plasma rico em plaquetas).

Figura 15 – Painel imuno-histoquímico para células CD31+



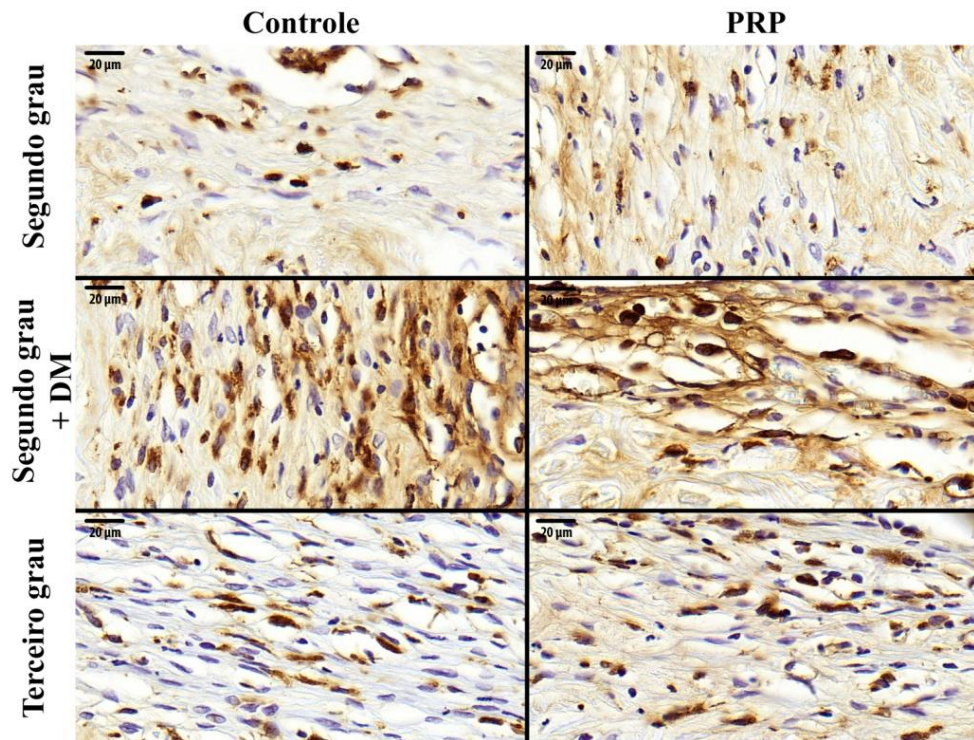
Legenda: Os grupos SG e SGD tratados com PRP apresentaram redução na contagem de células CD31+ (SG – queimadura de segundo grau; SGD – queimadura de segundo grau em ratos diabéticos; PRP – plasma rico em plaquetas).

Figura 16 – Painel imuno-histoquímico para células CD163+



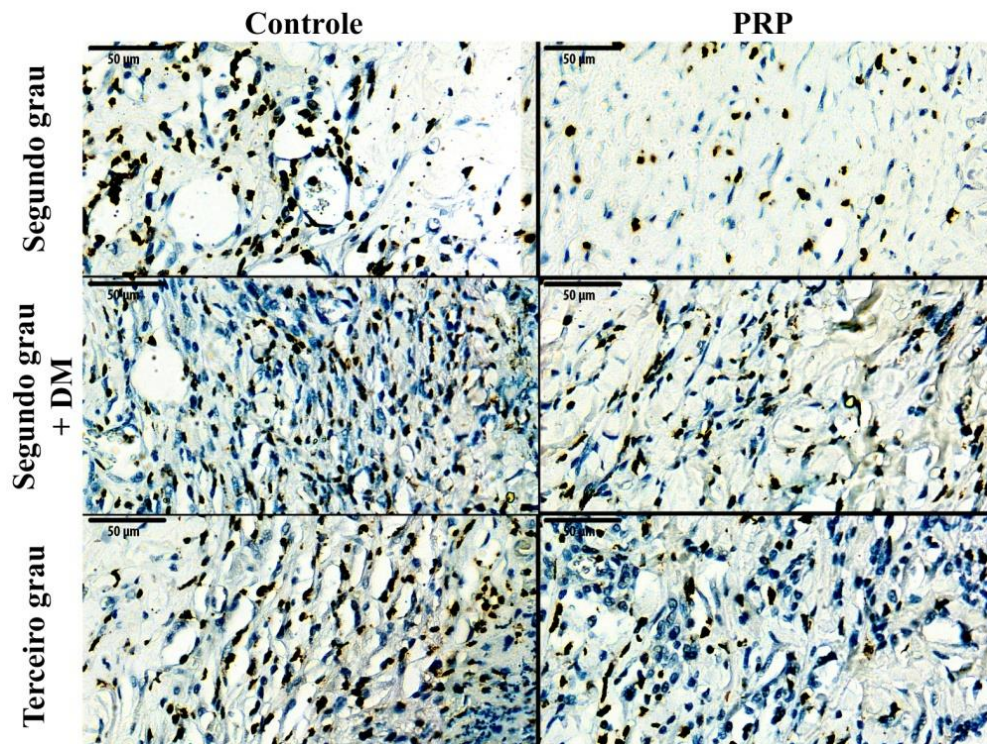
Legenda: Os grupos SG e SGD tratados com PRP apresentaram redução na contagem de células CD163+ (SG – queimadura de segundo grau; SGD – queimadura de segundo grau em ratos diabéticos; PRP – plasma rico em plaquetas).

Figura 17 – Painel imuno-histoquímico para células CD68+

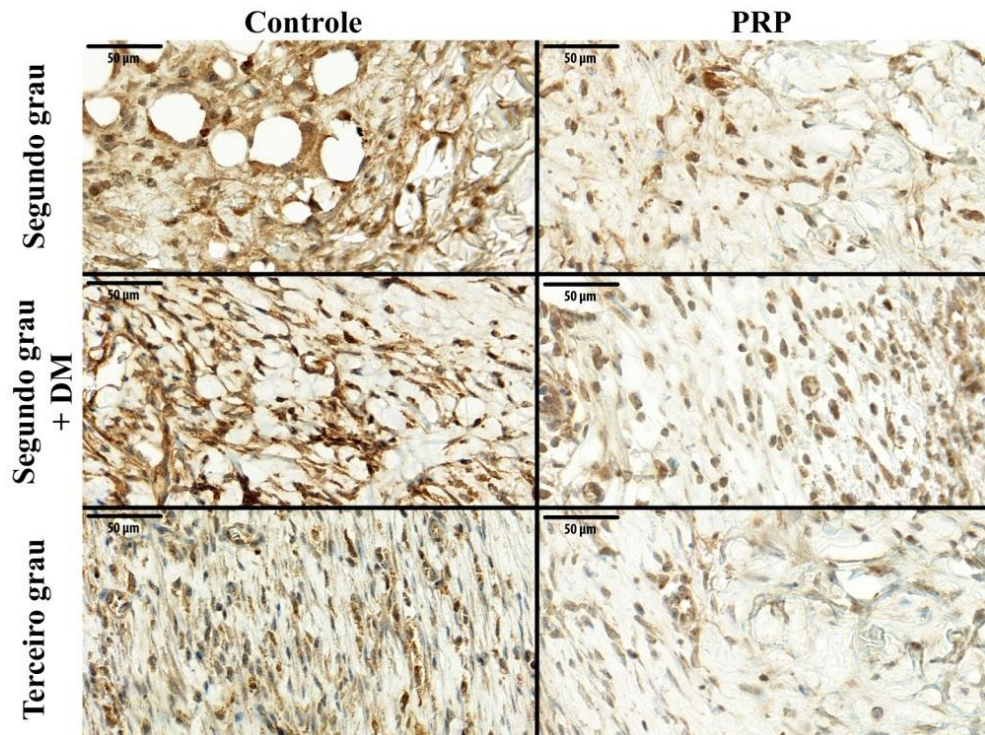


Legenda: Os grupos SG e SGD tratados com PRP apresentaram redução na contagem de células CD68+ (SG – queimadura de segundo grau; SGD – queimadura de segundo grau em ratos diabéticos; PRP – plasma rico em plaquetas).

Figura 18 – Painel imuno-histoquímico para células MPO+

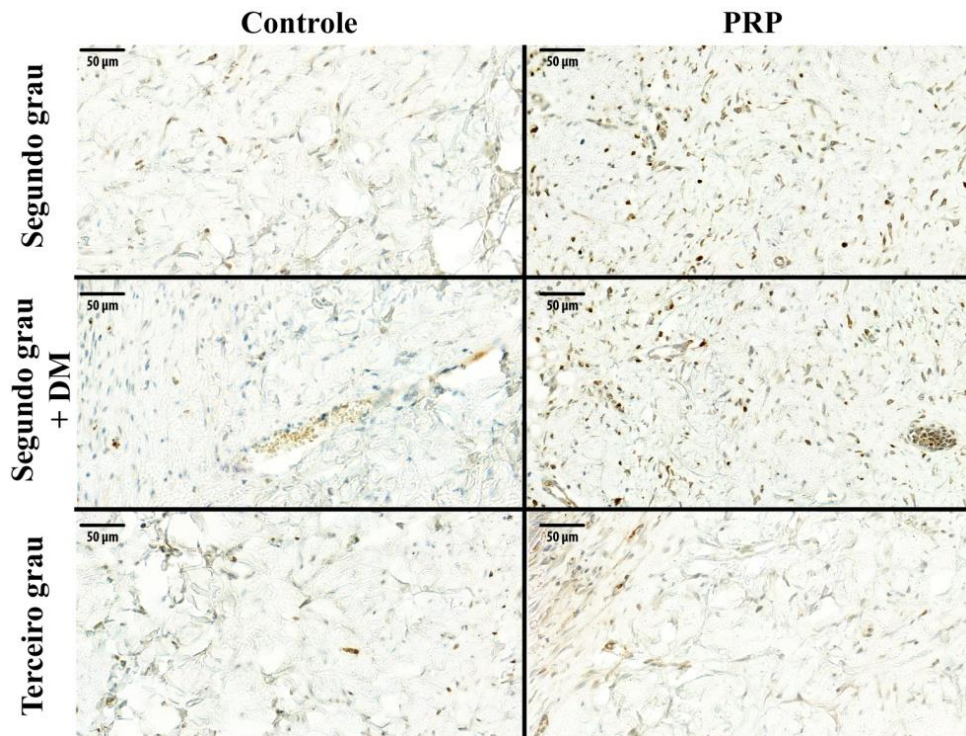


Legenda: Os grupos SG e SGD tratados com PRP apresentaram redução na contagem de células MPO+ (SG – queimadura de segundo grau; SGD – queimadura de segundo grau em ratos diabéticos; MPO – mieloperoxidase; PRP – plasma rico em plaquetas).

Figura 19 – Painel imuno-histoquímico para células TGF- β +

Legenda: Os grupos SG e SGD tratados com PRP apresentaram redução na contagem de células TGF- β (SG – queimadura de segundo grau; SGD – queimadura de segundo grau em ratos diabéticos; TGF- β – fator de crescimento transformante β ; PRP – plasma rico em plaquetas).

Figura 20 - Painel imuno-histoquímico para células MMP-2+



Legenda: Os grupos SG e SGD tratados com PRP apresentaram aumento na contagem de células MMP-2+ (SG – queimadura de segundo grau; SGD – queimadura de segundo grau em ratos diabéticos; MMP-2 – metaloproteinases da matriz; PRP – plasma rico em plaquetas).

5.2.6. Depósito de colágeno

Ao se mensurar o colágeno, observou-se que, no grupo SGD, ele foi menor nos animais controle do que nos tratados ($0,43 \pm 0,03$ ng/mg e $0,53 \pm 0,07$ ng/mg, respectivamente – $p < 0,05$). (TABELA 1)

Tabela 1 – Quantificação da hidroxiprolina.

	Segundo grau	Segundo grau + DM	Terceiro grau
Controle	0.89 ± 0.10	0.43 ± 0.03	0.53 ± 0.03
PRP	0.94 ± 0.12	$0.54 \pm 0.08^*$	0.67 ± 0.20

PRP – plasma rico em plaquetas; DM – diabetes *mellitus*; * $P < 0,05$

6. DISCUSSÃO

Na criação do modelo experimental de queimaduras, foram observadas algumas premissas importantes: a depilação é mandatória, pois o pelo impossibilitaria a confecção de uma queimadura uniforme^{61,64} e os animais foram mortos no terceiro dia, uma vez que se constitui no tempo necessário para que a queimadura atinja a sua demarcação final.^{60,61}

Utilizou-se um cilindro de alumínio acoplado a um ferro de solda elétrico com temperatura controlada. O fato de não se utilizar água aquecida no experimento eliminou o risco de vazamentos ou a produção de queimaduras irregulares pelas gotículas de vapor (*coldspots*) e, além disso, reduziu o risco da equipe que manuseia o equipamento.^{66,68-70}

Para que uma queimadura de contato seja reprodutível é necessário que sempre haja pressão idêntica em todas as queimaduras. Esse aspecto foi resolvido pela associação da técnica de fixação lateral (contato perpendicular) e pelo fato de o equipamento possuir um sistema de peso de 1 kg.^{59,69,71}

Brans *et al.* justificam que modelos de escaldadura seriam mas adequados que os de contato, pois estes permitiriam confeccionar queimaduras SG enquanto os modelos de contato apenas TG. Contudo, essa premissa foi fundamentada na comparação entre as duas técnicas,⁶⁵ o que parece ser inadequado, haja vista que foram utilizadas temperaturas bem distintas para cada uma (no caso da escaldadura, esses autores utilizaram 80 °C e, para contato, 170 °C). Essa diferença marcante entre as temperaturas (90 °C) não permite a comparação fidedigna entre as duas técnicas.

O modelo experimental desenvolvido para este experimento foi de contato, com controle preciso da temperatura e pressão, permitindo uma queimadura uniforme e reprodutível.¹¹⁸ O modelo utilizado possui diversas características desejáveis: baixo custo, fácil manuseio, seguro para a equipe, produção de queimaduras uniformes e reprodutíveis de diferentes profundidades e diâmetros. Contudo, apresenta limitação, pelo fato de que diâmetros maiores não conseguiriam contato total com a pele do rato, limitando a SCQ total que pode ser obtida.

O equipamento utilizado é de simples confecção, sendo os elementos empregados facilmente adquiridos em loja de materiais de construção e de componentes elétricos. Entretanto, pelo fato dessas peças serem industriais, podem não possuir grande precisão. Assim, após a montagem, torna-se necessário testar as voltagens, de modo a se obter os parâmetros desejados.

O modelo experimental desenvolvido não elimina completamente o risco à equipe da pesquisa, mas o reduz significativamente, por ser de fácil manuseio e, inclusive, pelo fato de poder ser manipulado por somente uma pessoa. Outra vantagem seria que, com o controle preciso da temperatura, é possível realizar queimaduras de SG superficial, SG profundo ou TG, dependendo da temperatura e do tempo de exposição. Além disso, o uso de cilindros de diferentes diâmetros, modificando-se a área total queimada.

Em relação ao PRP, optou-se pelo protocolo utilizado por Messoro,⁹³ para garantir a melhor qualidade do PRP: dupla centrifugação (a primeira a 160 G e a segunda a 400 G), pois estudos onde se utiliza centrifugação única mostraram menores concentrações que o obtido pela dupla centrifugação, já que as hemácias interferem na separação das plaquetas.^{15,94,97}

O anticoagulante utilizado foi o citrato de sódio que, apesar de render menos plaquetas que o EDTA, não as danifica, pois plaquetas danificadas não liberam FCs, quando ativadas.⁹⁰ A ativação foi realizada com cloreto de cálcio a 10%, pois outros autores mostraram que produz valores mais elevados de FC e não possui possíveis complicações pelo uso da trombina, como resposta imune ou inibição de proliferação celular.^{101,103} As variáveis escolhidas para o preparo do PRP permitem a maior concentração plaquetária, com menor dano a esses elementos e maiores valores de FCs, após ativação.

Quando as queimaduras foram tratadas com PRP, observou-se que o PRP reduziu o tempo necessário para o fechamento da queimadura do grupo SG, quando comparado com o grupo controle, mesmo quando este estava associado com DM (SGD), mas não se observou qualquer melhora no grupo TG. Uma explicação plausível para o fechamento precoce somente das queimaduras SG é que o PRP, para ser efetivo, necessita de um substrato, tal como as células epiteliais remanescentes localizadas nos apêndices cutâneos, que estão presentes nas queimaduras de SG e ausentes nas de TG.

Nas fases iniciais da cicatrização, observa-se aumento do número de macrófagos e neutrófilos, células responsáveis pela fagocitose de bactérias e debris, e a produção de FC.¹ Nos grupos SG e SGD tratados com PRP, em D21 detectou-se redução de neutrófilos (células MPO+), macrófagos residentes (CD163+) e macrófagos infiltrantes (CD68+), pois o processo de cicatrização encontra-se mais avançado que no grupo controle. Outro fato que confirma esta hipótese é que, nos mesmos grupos, as células TGF- β + também se encontram reduzidas.

Maciel *et al*, trabalhando com modelo equino, utilizaram microscopia eletrônica para analisar queimaduras de SG profundas tratadas com PRP. O grupo PRP, em D15, exibia a presença de fibrilas de colágeno, sendo esta mesma observação somente observada no grupo controle em D30. Já no mesmo dia, o grupo tratado apresentava organização maior do

colágeno que o grupo controle, mas em D45 dia ambas as feridas possuíam o mesmo aspecto.¹¹⁹ Contudo, este estudo pode ser questionado, haja vista que os autores inicialmente realizaram a excisão parcial da derme dos animais e, em seguida, realizaram a queimadura do tecido abaixo da ferida, não se podendo caracterizar essas feridas como verdadeiras queimaduras SG.

PRP pode acelerar o fechamento de queimaduras SG profundas crônicas (que não cicatrizavam) tratadas com enxerto de pele parcial.¹²⁰ Klosova *et al.* mensuraram a viscoelasticidade da pele de forma não invasiva nos primeiro, terceiro, sexto e décimo segundo meses do período pós-operatório. No terceiro mês, a viscoelasticidade foi similar à da pele normal no grupo tratado, enquanto no grupo controle esse mesmo resultado somente foi obtido no sexto mês.¹²⁰

Esse preparado também já foi utilizado para acelerar outras lesões de partes moles, tanto em modelos experimentais como em humanos. Em um modelo equino com de lesão pele total aguda, o grupo tratado com PRP apresentou 100% de epitelização em D5, comparado a 33% do grupo controle; em D10, todas as lesões estavam epitelizadas e em D45 não havia diferença histológica entre os grupos.¹²¹ Hom *et al.* trataram biópsias tipo *punch* em humanos com PRP e concluíram ocorrer cicatrização mais precoce quando comparado ao controle.¹²² Kanuto *et al* trataram a área doadora de um enxerto parcial de pele de uma paciente com PRP e observaram que a epitelização já havia ocorrido em uma área maior no décimo dia, com biópsia evidenciando epiderme mais espessa e aumento no número de vasos alfa-actina positivos.¹¹⁴

Pacientes com traumas complexos de membros inferiores com fraturas ósseas associadas à necrose cutânea são tratados, inicialmente, de forma conservadora, para que se consiga um leito cirúrgico de boa qualidade antes de se realizar a fixação da fratura. Em pacientes em que o PRP foi utilizado, o tempo necessário para se obter a melhora da ferida foi abreviado, permitindo que fossem operados mais precocemente.¹²³ Adicionalmente, em dois estudos, Marquez-de-Aracema *et al.* analisaram queimaduras oculares (tipos II e III) em humanos tratados com PRP e observaram cicatrização mais rápida no grupo tratado que nos controles.^{124,125}

Nem todos os estudos com utilização de PRP mostram resultados satisfatórios. Um experimento em coelhos, em que lesões excisionais de espessura total da pele foram tratados com PRP, não mostrou diferença na epitelização, apesar de existir um tendência para tal ao final da segunda semana.¹²⁶ Man *et al.* realizaram procedimentos cirúrgicos estéticos para rejuvenescimento facial (*lifting* facial) e afirmaram que houve redução de sangramento,

necessidade de drenos e dor pós-operatória. Porém, após análise minuciosa do estudo, observa-se que não foi utilizado grupo controle¹²⁷ e a taxa de sangramento de 5% relatada se situava dentro dos valores normais do procedimento relatado em outros estudos.¹²⁸

Estudos *in vivo* confirmam as observações dos modelos animais que mostram redução no tempo de cicatrização de feridas de partes moles e ósseas, mas sem melhora na qualidade da ferida. Bi *et al.* mostraram que fraturas tibiais em cabras tratadas com PRP iniciavam as fases avançadas da cicatrização (deposição de colágeno e remodelação) mais precocemente do que em animais controle (D12 contra D16).⁷⁴ Similarmente, atletas profissionais com lesões musculares tratados com PRP tiveram retorno mais precoce às suas atividades normais, com menos dor associada, mas a cicatrização final foi idêntica.¹²⁹

No tocante à angiogênese, outra parte importante da fase inicial da cicatrização, Marx observou que em sítios doadores de enxerto parcial de pele tratados com PRP ocorria ausência de vascularização subsuperficial, indicativo de involução da fase vascular da cicatrização.¹⁴ Lindeboom *et al.*, utilizando um estudo tipo *split-mouth*, realizaram enxerto ósseo para aumentar a espessura do parede inferior do seio maxilar e aplicaram PRP em um dos lados sobre o retalho de mucosa utilizado para o acesso cirúrgico. Os retalhos foram avaliados por *Orthogonal Polarization Spectral Imaging*, um método não invasivo que utiliza luz polarizada para demonstrar a densidade capilar, sendo observado aumento da densidade capilar no retalho mucoso no 7.º dia no grupo tratado em relação ao controle, porém sem diferença em D14.⁷³

Em um modelo animal, com defeitos ligamentares em porcos, Lyras *et al.* observaram aumento de vasos CD31+ em D7 e D14, com utilização de PRP, porém em D21 e D28 ocorreu redução significativa desse parâmetro.¹³⁰ A redução de vasos CD31+ nas fases mais avançadas da cicatrização é parte da história natural da cicatrização, mas, nesse caso, ocorreu mais precocemente no grupo tratado. Em nosso experimento, os grupos SG e SGD tratados estavam em fases mais avançadas da cicatrização (remodelação), justificando a redução de vasos CD31+.

Em relação à densidade vascular, existem relatos na literatura médica que, inicialmente, parecem ser distintos dos observados neste estudo. Em uma pesquisa em coelhos com feridas de espessura total da derme tratadas com diferentes volumes de PRP, não se observou diferença na contagem de vasos em D7 e D14.¹²⁶ Takikawa *et al.* observaram aumento do número de vasos em retalho preventivamente tratado com PRP em D7.¹³¹ Em ambos os casos, contudo, o fim dos experimentos ocorreu mais precocemente (D7 ou D14) do que neste estudo (D21).

Já Nakamura *et al.* demonstraram que não existia diferença no número de vasos em enxerto de gordura em ratos até D20, porém em D30 e D120 esse número foi maior no grupo tratado.¹¹² Acredita-se que isso seja devido à maior taxa de sobrevivência dos adipócitos (25% contra 4%), o que demandaria maior aporte sanguíneo e, logo, maior número de vasos.

Alguns estudos focam no fluxo sanguíneo ao invés do número de vasos. Gomez-Caro *et al.* mostraram aumento de fluxo transanastomótico num modelo de ressecção traqueal em D30, sem qualquer diferença no número de vasos, sob análise microscópica.¹³² Zhou *et al.* observaram, em um modelo de ferida abdominal aberta em D7, que os animais tratados apresentavam aumento da perfusão sanguínea, tecido de granulação mais espesso, aumento no número de fibroblastos e aumento de vasos CD31+, quando comparados com o controle,⁸⁷ porém o final do experimento também foi mais precoce que neste estudo.

Já nas fases mais tardias da cicatrização (remodelação), observa-se a MMP2, que é uma colagenase envolvida na quebra da MEC, uma ação habitual do processo fisiológico da cicatrização. Como na hipótese exposta anteriormente, os valores mais altos de MMP2 observados nos grupos tratados SG e SGD constituem o reflexo de que esses dois grupos estariam em fases mais avançadas da cicatrização do que o grupo controle.

Grandes feridas tratadas com pele produzida por engenharia de tecidos associada a um único FC isolado (bFGF ou EGF) ou PRP mostraram melhor organização, maiores taxa de cicatrização e níveis mais elevados de marcadores de adesão e proteínas estruturais (*Cytokeratin pan antibody* (pan-CK), *cytokeratin-15* (CK15), vimentin e CD29) com o PRP.¹³³

DM afeta todas as fases da cicatrização, inclusive com redução dos níveis de FCs, porém Moulin *et al.* demonstraram que esta redução é parcialmente revertida em feridas excisionais totais de pele em ratos com diabetes tratados com PRP.⁴⁶ É interessante também observar que o PRP parece exibir efeito amplificado sobre lesões diabéticas. Isso pode ser explicado, em parte, pela observação que PRP incubado e ativado com fluido de feridas crônicas de úlceras diabéticas produz níveis de FCs mais elevados do que PRP incubado com solução salina de fosfato tamponada.¹³⁴

Revisões sobre o tratamento de úlceras de pé mostraram que a utilização de PRP levou a melhores resultados em feridas consideradas piores (alto grau) ou recalcitrantes.^{46,135} Ao que parece, feridas mais graves respondem melhor ao tratamento com PRP do que feridas menos graves. Essa observação levanta a questão, sobre o fato de que, neste estudo, PRP não foi eficaz nas queimaduras de TG. Acredita-se que isso se deva ao fato de que, para atuar, PRP necessita de um substrato mínimo (células epiteliais remanescentes nos apêndices cutâneos),

que está presente nas queimaduras de SG, mas ausente nas de TG (haja vista a extensa destruição tecidual).

O uso de PRP em queimaduras poderia ser útil por reduzir sangramento, aumentar a taxa de sucesso de enxertos e acelerar a cicatrização,⁹⁶ mas alguns autores receiam que o aumento da fase inflamatória e a proliferação de fibroblastos poderia levar ao desenvolvimento de uma cicatriz hipertrófica.^{13,92,136} Apesar da espessura do tecido de granulação nos grupos SGD e TG ser significativamente maior que seus controles, ela não foi maior do que a encontrada no grupo SG, independentemente se controle ou tratado com PRP. Também cabe assinalar que ratos não desenvolvem cicatrizes hipertróficas, não se prestando, pois, para esse tipo de avaliação. Acredita-se que a razão seria a presença do *panniculus carnosus*, que permite a pele deslizar sobre a fascia, facilitando a contração da ferida.¹³⁷

Ressalta-se o fato de que a estrutura da pele humana é distinta de ratos, que possuem pelos em toda a sua extensão cutânea, com ausência de glândulas sudoríparas ou papilas dérmicas. A cicatrização nesses animais se dá, principalmente, por contração, enquanto em seres humanos ocorre granulação seguida de epitelização. Essa observação, por si, limita a possibilidade de transferência de conhecimento adquirido em uma espécie para a outra.

Também existem algumas limitações a este estudo. Uma delas se refere à área total onde o PRP pode ser aplicado, pois apenas 10% do sangue coletado podem ser convertidos em PRP. Dessa forma, o PRP somente pode ser empregado em pequenas áreas, como mãos ou pescoço, porém mínimas melhorias nessas regiões teriam, sem dúvida, grande repercussão na qualidade de vida. Além disso, torna-se imperativo que os efeitos do PRP sejam analisados em fases anteriores da cicatrização. Também se deve atentar para o fato de que, em seres humanos, é inviável a coleta sanguínea para o preparo do PRP antes que o paciente sofra a queimadura, como realizado no experimento. Por isso, seria recomendável realizar o experimento com a utilização de PRP preparado após a indução de queimadura nos ratos doadores, haja vista que não são conhecidos os efeitos do trauma sobre a qualidade do PRP obtido, analisando-se o efeito do PRP nos dados obtidos em fases mais precoces da cicatrização.

Também se constitui um fator limitante a este estudo o fato do PRP ser preparado com animais isogênicos e não da forma autólogo. Isso decorre do fato de que, se o PRP fosse autólogo, apenas pequenos volumes desse preparado poderiam ser obtidos, não sendo possível tratar a área total da queimadura. Esta forma de preparo poderia, eventualmente, determinar grande influência sobre os resultados. Contudo, observamos que o PRP obtido de ratos

isogênicos foi suficiente para acelerar a cicatrização e que, possivelmente, este efeito será maior com a utilização do PRP de ratos autólogos.

CONCLUSÕES

O modelo experimental desenvolvido é simples, seguro, preciso e de baixo custo, permitindo a obtenção de queimaduras reprodutíveis de diferentes profundidades e com diâmetro ajustável.

PRP acelera a cicatrização em queimaduras de segundo grau em ratos normais (SG) e com diabetes induzida (SGD), mas não interfere nas queimaduras de terceiro grau (TG).

REFERÊNCIAS

1. SINGER, A.J. and CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, v. 341, n. 10, p. 738-46, 1999.
2. BREM, H. and TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*, v. 117, n. 5, p. 1219-22, 2007.
3. PEARL, S.H. and KANAT, I.O. Diabetes and healing: a review of the literature. *J Foot Surg*, v. 27, n. 3, p. 268-70, 1988.
4. MARIANO, R. *et al.* Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 109, n. 1, p. 72-8, 2010.
5. VILLELA, D.L. and SANTOS, V.L. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review. *Growth Factors*, v. 28, n. 2, p. 111-6, 2010.
6. WERNER, S. and GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, v. 83, n. 3, p. 835-70, 2003.
7. BAXTER, C.R. Fluid volume and electrolyte changes of the early postburn period. *Clin Plast Surg*, v. 1, n. 4, p. 693-703, 1974.
8. PRUITT, B.A., JR. Fluid and electrolyte replacement in the burned patient. *Surg Clin North Am*, v. 58, n. 6, p. 1291-1312, 1978.
9. ALVARADO, R. *et al.* Burn resuscitation. *Burns*, v. 35, n. 1, p. 4-14, 2009.
10. PENN, J.W.; GROBBELAAR, A.O. and ROLFE, K.J. The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma*, v. 2, n. 1, p. 18-28, 2012.
11. WIDGEROW, A.D. Hypertrophic burn scar evolution and management. *Wound Healing SA*, v. 6, n. 2, p. 79-86, 2013.
12. SPANHOLTZ, T.A. *et al.* Severe burn injuries: acute and long-term treatment. *Dtsch Arztebl Int*, v. 106, n. 38, p. 607-13, 2009.
13. PALLUA, N.; WOLTER, T. and MARKOWICZ, M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns*, v. 36, n. 1, p. 4-8, 2010.
14. MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 62, n. 4, p. 489-96, 2004.
15. MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*, v. 10, n. 4, p. 225-8, 2001.

16. BUGANZA TEPOLE, A. and KUHL, E. Systems-based approaches toward wound healing. *Pediatr Res*, v. 73, n. 4 Pt 2, p. 553-63, 2013.
17. YOUNG, A. and MCNAUGHT, C.E. The physiology of wound healing. *Surgery*, v. 29, n. 10, p. 475-9, 2011.
18. REINKE, J.M. and SORG, H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.
19. MAHDAVIAN DELAVARY, B. *et al.* Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, v. 216, n. 7, p. 753-62, 2011.
20. PAKYARI, M. *et al.* Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, v. 2, n. 5, p. 215-224, 2013.
21. BRANCATO, S.K. and ALBINA, J.E. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol*, v. 178, n. 1, p. 19-25, 2011.
22. PENCE, B.D. and WOODS, J.A. Exercise, obesity, and cutaneous wound healing: evidence from rodent and human studies. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, v. 3, n. 1, p. 71-79, 2014.
23. GETHIN, G. Understanding the inflammatory process in wound healing. *Br J Community Nurs*, v. Suppl, p. S17-8, S20, S22, 2012.
24. KOH, T.J. and DIPIETRO, L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*, v. 13, p. e23, 2011.
25. RAFEHI, H.; EL-OSTA, A. and KARAGIANNIS, T.C. Genetic and epigenetic events in diabetic wound healing. *Int Wound J*, v. 8, n. 1, p. 12-21, 2011.
26. MIAO, M. *et al.* Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation. *Wound Repair Regen*, v. 20, n. 2, p. 203-13, 2012.
27. NOVAK, M.L. and KOH, T.J. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*, v. 93, n. 6, p. 875-81, 2013.
28. DAVIES, L.C. *et al.* Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*, v. 14, n. 10, p. 986-95, 2013.
29. LO, D.D. *et al.* Scarless fetal skin wound healing update. *Birth Defects Res C Embryo Today*, v. 96, n. 3, p. 237-47, 2012.
30. SCHULTZ, G.S. *et al.* Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen*, v. 19, n. 2, p. 134-48, 2011.
31. NOWAK, J.A. *et al.* Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell*, v. 3, n. 1, p. 33-43, 2008.

32. PASTAR, I. *et al.* Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, v. 3, n. 7, p. 445-464, 2014.
33. RAMIREZ, H.; PATEL, S.B. and PASTAR, I. The role of TGFbeta signaling in wound epithelialization. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, v. 3, n. 7, p. 482-491, 2014.
34. LI, J.; ZHANG, Y.P. and KIRSNER, R.S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*, v. 60, n. 1, p. 107-14, 2003.
35. WIETECH, M.S. and DIPIETRO, L.A. Therapeutic approaches to the regulation of wound angiogenesis. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, v. 2, n. 3, p. 81-86, 2013.
36. WONG, V.W. and CRAWFORD, J.D. Vasculogenic cytokines in wound healing. *Biomed Res Int*, v. 2013, p. e11, 2013.
37. GURTNER, G.C. *et al.* Wound repair and regeneration. *Nature*, v. 453, n. 7193, p. 314-21, 2008.
38. FINNISON, K.W. *et al.* Dynamics of transforming growth factor beta signaling in wound healing and scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, v. 2, n. 5, p. 195-214, 2013.
39. KNAPINSKA, A. and FIELDS, G.B. Chemical biology for understanding matrix metalloproteinase function. *Chembiochem*, v. 13, n. 14, p. 2002-20, 2012.
40. GIBSON, D.J. and SCHULTZ, G.S. Molecular wound assessments: matrix metalloproteinases. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, v. 2, n. 1, p. 18-23, 2013.
41. MARTINS, V.L.; CALEY, M. and O'TOOLE, E.A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res*, v. 351, n. 2, p. 255-68, 2013.
42. ACKERMANN, P.W. and HART, D.A. Influence of comorbidities: neuropathy, vasculopathy, and diabetes on healing response quality. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, v. 2, n. 8, p. 410-421, 2013.
43. GANTWERKER, E.A. and HOM, D.B. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am*, v. 19, n. 3, p. 441-53, 2011.
44. KWAN, P. *et al.* Scar and contracture: biological principles. *Hand Clin*, v. 25, n. 4, p. 511-28, 2009.
45. TSIOUFIS, C. *et al.* The role of matrix metalloproteinases in diabetes mellitus. *Curr Top Med Chem*, v. 12, n. 10, p. 1159-65, 2012.
46. MOULIN, V. *et al.* Platelet releasate treatment improves skin healing in diabetic rats through endogenous growth factor secretion. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, v. 44, n. 6, p. 961-71, 1998.
47. PECK, M.D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. *Burns*, v. 37, n. 7, p. 1087-100, 2011.

48. *Burn Incidence and Treatment in the United States: 2013 Fact Sheet*. 2013; Available from: http://www.ameriburn.org/resources_factsheet.php.
49. TEOT, L. *et al.* Burn wound healing: Pathophysiology. In: KAMOLZ, L.P., et al. *Handbook of Burns Reconstruction and Rehabilitation*. Germany: SpringerWienNewYork, 2012. p. 47-53.
50. WANG, X. and KIMBLE, R. A review on porcine burn and scar models and their relevance to humans. *Wound Pract. Res* v. 18, n. 1, p. 41-9, 2010.
51. SINGH, V. *et al.* The pathogenesis of burn wound conversion. *Ann Plast Surg*, v. 59, n. 1, p. 109-15, 2007.
52. VAN HASSELT, E.J. *Burns Manual A manual for health workers*. 2nd ed., Holland: Nederlandse Brandwonden Stichting. 150. 2008.
53. JESCHKE, M. *et al.* Burns. In: TOWNSEND, C.M., et al. *Sabiston Textbook of Surgery: The biological basis of modern surgical practice*. Canada: Elsevier Saunders, 2012. p. 521-47.
54. HETTIARATCHY, S. and DZIEWULSKI, P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ*, v. 328, n. 7453, p. 1427-9, 2004.
55. FRIEDSTAT, J.; ENDORF, F.W. and GIBRAN, N.S. Burns. In: BRUNICARDI, F.C., et al. *Schwartz's Principles of Surgery*. New York: McGraw-Hill Education, 2010. p. 227-39.
56. LADAK, A. and TREDGET, E.E. Pathophysiology and management of the burn scar. *Clin Plast Surg*, v. 36, n. 4, p. 661-74, 2009.
57. BARRIENTOS, S. *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.
58. STELLA, M.; CASTAGNOLI, C. and GANGEMI, E.N. Postburn scars: an update. *Int J Low Extrem Wounds*, v. 7, n. 3, p. 176-81, 2008.
59. SINGER, J.A. *et al.* Does pressure matter in creating burns in a porcine model?. *J Burn Care Res*, v. 31, n. 4, p. 646-51, 2010.
60. SINGER, A.J. *et al.* Standardized burn model using a multiparametric histologic analysis of burn depth. *Acad Emerg Med*, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2000.
61. KNABL, J.S. *et al.* Controlled partial skin thickness burns: an animal model for studies of burnwound progression. *Burns*, v. 25, n. 3, p. 229-35, 1999.
62. CAI, E.Z. *et al.* Creation of consistent burn wounds: a rat model. *Arch Plast Surg*, v. 41, n. 4, p. 317-24, 2014.

63. LATIF, R. *et al.* Development of a simple burn mouse model and its evaluation to study the efficacy of soframycin against *Pseudomonas aeruginosa* infected burns. *Indian J. Med. Microbiol*, v. 10, n. 1, p. 23-8, 1992.
64. KAUFMAN, T. *et al.* Deep partial skin thickness burns: a reproducible animal model to study burn wound healing. *Burns*, v. 16, n. 1, p. 13-6, 1990.
65. BRANS, T.A. *et al.* Histopathological evaluation of scalds and contact burns in the pig model. *Burns*, v. 20 Suppl 1, p. S48-51, 1994.
66. PFURTSCHELLER, K. *et al.* Innovative scald burn model and long-term dressing protector for studies in rats. *J Trauma Acute Care Surg*, v. 74, n. 3, p. 932-5, 2013.
67. DAVIS, J.W. and HANSBROUGH, J.F. Use of overhead hooks in burn surgery. *J Burn Care Rehabil*, v. 9, n. 5, p. 492, 1988.
68. WALKER, H.L. and MASON, A.D., JR. A standard animal burn. *J Trauma*, v. 8, n. 6, p. 1049-51, 1968.
69. GAINES, C. *et al.* Development of a porcine deep partial thickness burn model. *Burns*, v. 39, n. 2, p. 311-9, 2013.
70. DINAR, S. *et al.* A new material for the standard burn model: Allevyn adhesive. *Plast Reconstr Surg*, v. 117, n. 2, p. 717-8, 2006.
71. HEREDERO, F.X.S. *et al.* Experimental burn models. *Annals of Burns and Fire Disasters*, v. 9, n. 2, p. 96-7, 1996.
72. SCIMECA, C.L. *et al.* Novel use of platelet-rich plasma to augment curative diabetic foot surgery. *J Diabetes Sci Technol*, v. 4, n. 5, p. 1121-6, 2010.
73. OPLINDEBOOM, J.A. *et al.* Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing. *Clin Oral Implants Res*, v. 18, n. 1, p. 133-9, 2007.
74. BI, L. *et al.* Reconstruction of goat tibial defects using an injectable tricalcium phosphate/chitosan in combination with autologous platelet-rich plasma. *Biomaterials*, v. 31, n. 12, p. 3201-11, 2010.
75. ZHANG, Y. *et al.* Growth factor therapy in patients with partial-thickness burns: a systematic review and meta-analysis. *Int Wound J*, 2014.
76. EPPLEY, B.L.; PIETRZAK, W.S. and BLANTON, M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*, v. 118, n. 6, p. 147e-159e, 2006.
77. RODRIGUEZ-FLORES, J. *et al.* Influence of platelet-rich plasma on the histologic characteristics of the autologous fat graft to the upper lip of rabbits. *Aesthetic Plast Surg*, v. 35, n. 4, p. 480-6, 2011.

78. ARORA, N.S. *et al.* Platelet-rich plasma in sinus augmentation procedures: a systematic literature review: Part II. *Implant Dent*, v. 19, n. 2, p. 145-57, 2010.
79. OH, D.S. *et al.* Activated platelet-rich plasma improves fat graft survival in nude mice: a pilot study. *Dermatol Surg*, v. 37, n. 5, p. 619-25, 2011.
80. THOR, A. *et al.* Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 36, n. 12, p. 1164-71, 2007.
81. FRESNO, L. *et al.* Effects of platelet-rich plasma on intestinal wound healing in pigs. *Vet J*, v. 185, n. 3, p. 322-7, 2010.
82. KANTHAN, S.R. *et al.* Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-union critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury*, v. 42, n. 8, p. 782-9, 2011.
83. TOSCANO, N. and HOLTZCLAW, D. Surgical considerations in the use of platelet-rich plasma. *Compend Contin Educ Dent*, v. 29, n. 3, p. 182-5, 2008.
84. POWELL, C.A. *et al.* Periodontal wound healing with and without platelet-rich plasma: histologic observations and assessment of flap tensile strength. *J Periodontol*, v. 80, n. 6, p. 985-92, 2009.
85. CARVALHO, M.D. *et al.* Platelet-rich plasma plus bioactive glass in the treatment of intra-bony defects: a study in dogs. *J Appl Oral Sci*, v. 19, n. 1, p. 82-9, 2011.
86. ALMDAHL, S.M. *et al.* Randomized prospective trial of saphenous vein harvest site infection after wound closure with and without topical application of autologous platelet-rich plasma. *Eur J Cardiothorac Surg*, v. 39, n. 1, p. 44-8, 2011.
87. ZHOU, B. *et al.* Rapidly in situ forming platelet-rich plasma gel enhances angiogenic responses and augments early wound healing after open abdomen. *Gastroenterol Res Pract*, v. 2013, p. 926764, 2013.
88. MARX, R.E. *et al.* Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 85, n. 6, p. 638-46, 1998.
89. BABBUSH, C.A.; KEVY, S.V. and JACOBSON, M.S. An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dent*, v. 12, n. 1, p. 24-34, 2003.
90. LANDESBURG, R.; ROY, M. and GLICKMAN, R.S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 58, n. 3, p. 297-300; discussion 300-1, 2000.
91. LACOSTE, E.; MARTINEAU, I. and GAGNON, G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol*, v. 74, n. 10, p. 1498-507, 2003.

92. CARRILLO-MORA, P. *et al.* Platelets-rich plasma: a versatile tool for regenerative medicine?. *Cir Cir*, v. 81, n. 1, p. 74-82, 2013.
93. MESSORA, M.R. *et al.* A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats. *RSBO*, v. 8, n. 3, p. 299-304, 2011.
94. MESSORA, M.R. *et al.* Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) - estudo experimental em coelhos. *RSBO*, v. 6, n. 3, p. 291-6, 2009.
95. NAGATA, M.J. *et al.* Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol*, v. 36, n. 9, p. 775-83, 2009.
96. MARCK, R.E.; MIDDELKOOP, E. and BREEDERVELD, R.S. Considerations on the use of platelet-rich plasma, specifically for burn treatment. *J Burn Care Res* v. 35, n. 3, p. 219-27, 2014.
97. GEANEY, L.E. *et al.* The effects of platelet-rich plasma on the tendon and ligament: basic science and clinical application. *Operative Techniques in Sports Medicine*, v. 19, n. 3, p. 160-4, 2011.
98. NAGATA, M.J. *et al.* Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent*, v. 4, n. 4, p. 395-402, 2010.
99. NAGATA, M.J. *et al.* Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Orthop Res*, v. 28, n. 4, p. 468-73, 2010.
100. NAGATA, M. *et al.* Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone*, v. 45, n. 2, p. 339-45, 2009.
101. MESSORA, M.R. *et al.* Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res*, v. 43, n. 6, p. 723-9, 2008.
102. MARTINEAU, I.; LACOSTE, E. and GAGNON, G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials*, v. 25, n. 18, p. 4489-502, 2004.
103. HARRISON, S. *et al.* Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *Am J Sports Med*, v. 39, n. 4, p. 729-34, 2011.
104. ADLER, S.C. and KENT, K.J. Enhancing wound healing with growth factors. *Facial Plast Surg Clin North Am*, v. 10, n. 2, p. 129-46, 2002.
105. LIU, H.Y. *et al.* The balance between adipogenesis and osteogenesis in bone regeneration by platelet-rich plasma for age-related osteoporosis. *Biomaterials*, v. 32, n. 28, p. 6773-80, 2011.

106. HAN, S.K. *et al.* Potential use of blood bank platelet concentrates to accelerate wound healing of diabetic ulcers. *Ann Plast Surg*, v. 59, n. 5, p. 532-7, 2007.
107. MONTELEONE, K.; MARX, R.E. and GHURANI, R. *Healing enhancement of skin graft donor sites with platelet-rich plasma*. In *82nd Annual American Academy of Oral and Maxillofacial Surgery Meeting*. 2000. San Francisco, CA.
108. ARORA, N.S. *et al.* Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent*, v. 18, n. 4, p. 303-10, 2009.
109. KIM, J.H.; PARK, C. and PARK, H.M. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol*, v. 20, n. 2, p. 123-6, 2009.
110. MILORO, M.; HARALSON, D.J. and DESA, V. Bone healing in a rabbit mandibular defect using platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 68, n. 6, p. 1225-30, 2010.
111. GUMIEIRO, E.H. *et al.* Platelet-rich plasma in bone repair of irradiated tibiae of Wistar rats. *Acta Cir Bras*, v. 25, n. 3, p. 257-63, 2010.
112. NAKAMURA, S. *et al.* Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats. *Ann Plast Surg*, v. 65, n. 1, p. 101-6, 2010.
113. CHO, J.M. *et al.* Effect of platelet-rich plasma on ultraviolet b-induced skin wrinkles in nude mice. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, v. 64, n. 2, p. e31-9, 2011.
114. KAKUDO, N. *et al.* Platelet-rich plasma promotes epithelialization and angiogenesis in a splitthickness skin graft donor site. *Med Mol Morphol*, v. 44, n. 4, p. 233-6, 2011.
115. MARQUES, R.G.; MORALES, M.M. and PETROIANU, A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras*, v. 24, n. 1, p. 69-74, 2009.
116. GODA, T. *et al.* Effect of sucrose and Acarbose feeding on the development of streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, v. 28, n. 1, p. 41-56, 1982.
117. WOESSNER, J.F., JR. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*, v. 93, p. 440-7, 1961.
118. VENTER, N.G.; MONTE-ALTO-COSTA, A. and MARQUES, R.G. A new model for the standardization of experimental burn wounds. *Burns*, 2014. *In press*.
119. MACIEL, F.B. *et al.* Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. *Burns*, v. 38, n. 7, p. 1058-65, 2012.
120. KLOSOVA, H. *et al.* Objective evaluation of the effect of autologous platelet concentrate on post-operative scarring in deep burns. *Burns*, v. 39, n. 6, p. 1263-76, 2013.

121. DEROSS, R. *et al.* Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cir Bras*, v. 24, n. 4, p. 276-81, 2009.
122. HOM, D.B.; LINZIE, B.M. and HUANG, T.C. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg*, v. 9, n. 3, p. 174-83, 2007.
123. KAZAKOS, K. *et al.* The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury*, v. 40, n. 8, p. 801-5, 2009.
124. MARQUEZ-DE-ARACENA, R. *et al.* Subconjunctival application of plasma platelet concentrate in the treatment of ocular burns. Preliminary results. *Arch Soc Esp Oftalmol*, v. 82, n. 8, p. 475-81, 2007.
125. MARQUEZ DE ARACENA DEL CID, R. and MONTERO DE ESPINOSA ESCORIAZA, I. Subconjunctival application of regenerative factor-rich plasma for the treatment of ocular alkali burns. *Eur J Ophthalmol*, v. 19, n. 6, p. 909-15, 2009.
126. LEE, H.W. *et al.* Efficacy of platelet-rich plasma on wound healing in rabbits. *J Periodontol*, v. 79, n. 4, p. 691-6, 2008.
127. MAN, D.; PLOSKER, H. and WINLAND-BROWN, J.E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*, v. 107, n. 1, p. 229-37; discussion 238-9, 2001.
128. DESTRO, M.W.; DESTRO, C. and BAROUDI, R. Pontos de adesão nas ritidoplastias: estudo comparativo. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v. 28, p. 55-58, 2013.
129. HAMID, M.S.; YUSOF, A. and MOHAMED ALI, M.R. Platelet-rich plasma (PRP) for acute muscle injury: a systematic review. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e90538, 2014.
130. LYRAS, D. *et al.* Immunohistochemical study of angiogenesis after local administration of platelet-rich plasma in a patellar tendon defect. *Int Orthop*, v. 34, n. 1, p. 143-8, 2010.
131. TAKIKAWA, M. *et al.* PRP&F/P MPs improved survival of dorsal paired pedicle skin flaps in rats. *J Surg Res*, v. 170, n. 1, p. e189-96, 2011.
132. GOMEZ-CARO, A.; AUSIN, P. and BOADA, M. Platelet rich plasma improves the healing process after airway anastomosis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, v. 13, n. 6, p. 552-6, 2011.
133. HAN, T.; WANG, H. and ZHANG, Y.Q. Combining platelet-rich plasma and tissue-engineered skin in the treatment of large skin wound. *J Craniofac Surg*, v. 23, n. 2, p. 439-47, 2012.
134. LUNDQUIST, R. *et al.* Characteristics of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds. *Wound Repair Regen*, v. 21, n. 1, p. 66-76, 2013.

135. GURGEN, M. Treatment of chronicwounds with autologous platelet-rich plasma. *EWMA Journal*, v. 8, n. 2, p. 5-11, 2008.
136. HENDERSON, J.L. *et al.* The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear Nose Throat J*, v. 82, n. 8, p. 598-602, 2003.
137. SEO, B.F.; LEE, J.Y. and JUNG, S.N. Models of abnormal scarring. *Biomed Res Int*, v. 2013, p. 423147, 2013.

ANEXO - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

ibrag
Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/056/2012** sobre **“AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS TRATADAS COM PLASMA RICOS EM PLAQUETAS EM RATOS”**, sob a responsabilidade de **Neil Grant Venter**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **03/10/2012**. Este certificado expira em **03/10/2016**.

Rio de Janeiro, 03 de Outubro de 2012.

Prof.a. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof.^a Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
/ass Matrícula 34765-8

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br